

**Aus dem Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin des Fachbereiches Medizin der  
Philipps-Universität Marburg**

Direktor: Prof. Dr. med. Rolf F. Maier

# Th17-Zellen während der Ontogenese und bei der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung

---

*Inaugural-Dissertation*

*zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin*

*dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg*

*vorgelegt von*

*Verena Coccejus aus Bad Kreuznach*

*Marburg 2020*

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:  
18.11.2020

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan i.V. der Prodekan: Prof. Dr. R. Müller

Referent: Herr Prof. Dr. R. Maier

1. Korreferent: Herr Prof. Dr. M. Lohoff

Gewidmet in Dankbarkeit meiner Familie

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>1</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>4</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>6</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>8</b>
<i>1.1. Die Th17-Zellen</i>	8
1.1.1. Die initiale Differenzierung von naiven T-Zellen zu Th17-Zellen	9
1.1.2. Die Beziehung zwischen Th17-Zellen und regulatorischen Th-Zellen	13
1.1.3. Die Zytokine der Th17-Zellen und deren Effekte	15
1.1.4. Übersicht und Zusammenfassung der Differenzierung von Th17-Zellen und Treg-Zellen	16
<i>1.2. Die Entwicklung des Immunsystems und die Rolle der Th17-Zellen bei Neugeborenen</i>	18
1.2.1. Die Entwicklung des Immunsystems in der Embryonal- und Fetalperiode	18
1.2.2. Das Immunsystem in der Neonatalperiode und die Rolle der Th17-Zellen beim Neugeborenen	19
<i>1.3. COPD und Th17-Zellen</i>	20
1.3.1. Die Definition und Pathogenese der COPD	20
1.3.2. Der Einfluss von Zigarettenrauch auf die Pathogenese der COPD	24
<i>1.4. Fragestellung</i>	26
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>27</b>
<i>2.1. Patienten und Probanden</i>	27
2.1.1. Neugeborene	27
2.1.2. Gesunde Kinder und Jugendliche	27
2.1.3. Erwachsene	28
<i>2.2. Probensammlung und -verarbeitung</i>	29

2.3. Zellisolation mit Ficoll	31
2.4. Ermittlung der Zellzahl	32
2.5. Zellstimulation während einer Kurzzeit-Zellkultur	33
2.6. Th17-Oberflächenzellfärbung sowie -intrazelluläre Färbung und Messung mit Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung	35
2.7. mRNA-Isolierung und Desoxyribonukleasenase (DNase)-Verdau	38
2.8. Reverse Transkription	40
2.9. Quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR)	42
2.10. Gelelektrophorese	45
2.11. Lungenfunktionstestung	47
2.12. Auswertung	48
2.12.1. Auswertung der Oberflächenfärbungen und der intrazellulär gefärbten Zellen	48
2.12.2. Auswertung der mittels qPCR erhobenen Daten	50
2.12.3. Statistische Auswertung	50
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>52</b>
3.1. Durchflusszytometrisch erhobene Daten	52
3.1.1. Unterschiedliche Anteile an Th17-Zellen: Vergleich von Nabelschnurblutproben und Proben erwachsener gesunder Probanden	52
3.1.2 Anteil der Th17-Zellen in Abhängigkeit vom Reifegrad der Neugeborenen	54
3.1.3. Altersabhängigkeit der Th-17-Zellfrequenz	56
3.1.4. Größerer Anteil an Th17-Zellen mit zunehmender Obstruktion bei COPD- Patienten	58
3.2. Die Expression von ROR $\gamma$ t und IL-17 auf Genebene	60
3.2.1. Gesteigerte Expression von ROR $\gamma$ t und IL-17 bei zunehmendem Th17-Zell- Anteil	60

<b>4. Diskussion</b>	<b>65</b>
4.1. Stärken und Schwächen dieser Studie	65
4.2. Geringere Anteile von Th17-Zellen im Nabelschnurblut als in Blutproben erwachsener Probanden	67
4.3. Die Stimulierbarkeit der Th17-Zellen nimmt mit dem Reifegrad von Neugeborenen zu	67
4.4. Altersabhängigkeit der Th-17-Zellfrequenz	69
4.5. Die Einsekundenkapazität nimmt mit steigendem Anteil von Th17-Zellen bei COPD-Patienten ab	70
4.6. Verstärkte Expression von IL-17 nach Kurzzeitstimulation	71
4.7. Zusammenfassung der diskutierten Aspekte dieser Arbeit	72
4.8. Schlussfolgerung und Ausblick	73
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>74</b>
<b>6. Abstract</b>	<b>76</b>
<b>7. Literaturverzeichnis</b>	<b>78</b>
<b>8. Anhang</b>	<b>85</b>
8.1. Patientenkollektiv	85
8.2. Veröffentlichungen	88
8.3. Verzeichnis meiner akademischen Lehrer an der Philipps-Universität Marburg	89
8.4. Danksagung	90

## Abkürzungsverzeichnis

**AHR** Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor

**APC** Allophycocyanin

**APC** Antigen-präsentierende Zelle (*antigen presenting cell*)

**BALF** Bronchoalveolar Lavage Fluid

**CCL20** Chemokinligand mit C-C-Motiv (*Chemokine (C-C motif) ligand 20*)

**CCR6** Chemokinrezeptor 6

**CD** Unterscheidungsgruppe (*cluster of differentiation*)

**cDNA** Komplementäre DNA (*complementary desoxyribonucleinacid*)

**CXCL1, 8, 10** Chemokinligand mit dem Motiv C-X-C 1, 8, 10

(*chemokine (C-X-C motif) ligand 1*)

**DNA** Desoxyribonukleinsäure (*desoxyribonucleinacid*)

**DNase** Desoxyribonukleinase

**FACS** Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (*fluorescenceactivated cell sorting*)

**FEV1** Einsekundenkapazität (*Forced Expiratory Volume in 1 second*)

**FITC** Fluoreszeinisothiocyanat

**Foxp3** Forkhead-Box-Protein P3

**GAPDH** Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

**GM-CSF** Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierende Faktor

(*granulocyt macrophage colony-stimulating factor*)

**GOLD** *Global Initiative For Chronic Obstructive Lung Disease*

**ICOS** *Inducible T-cell costimulator*

**IFN-γ** Interferon-γ

**IgM** Immunglobulin M

**IgG** Immunglobulin G

## Abkürzungsverzeichnis

**IL-17, 21, 22, 23** Interleukin-17, 21, 22, 23

**IRF4** regelnder Faktor des Interferon 4 (*Interferon regulatory factor 4*)

**iTreg-Zellen** induzierte regulatorische T-Zellen

**MHC** Haupthistokompatibilitätskomplex-Molekül

(*Major Histocompatibility Complex*)

**MIG** Interferon induzierte Monokine (*monokine induced by interferon*)

**MMP** Matrix-Metalloproteinasen

**mRNA** Boten-Ribonukleinsäure (*messenger ribonucleinacid*)

**nTreg-Zellen** natürliche regulatorische T-Zellen

**PBMC** Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes

(*peripheral blood mononuclear cells*)

**PBS** Phosphatgepufferte Salzlösung

**PE** Phycoerythrin

**PerCP** Peridinin-Chlorophyll-Protein-Komplex

**PMA** Phorbol-Myristat-Acetat

**qPCR** Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion

(*quantitative polymerase chain reaction*)

**RNA** Ribonukleinsäure (*ribonucleinacid*)

**RNase-freies Wasser** Ribonukleinasen-freies Wasser

**ROR $\alpha$**  *retinoic acid receptor-related orphan receptor alpha*

**RORc** *retinoic acid receptor-related orphan receptor c*

**ROR $\gamma$ t** *retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma*

**Runx 1** *Runt-related transcription factor 1*

**Smad 4** *SMAD Family Member 4*



**STAT3** Signaltransduktor und Aktivator der Transkription 3

*(signal transducer and activator of transcription 3)*

**TCR** T-Zell-Rezeptor (*T-cell-receptor*)

**TGFβ** Transformierender Wachstumsfaktor β (*transforming growth factor β*)

**Th-Zelle** T-Helfer-Zelle

**Th1-Zelle** T-Helfer-1-Zelle

**Th2-Zelle** T-Helfer-2-Zelle

**Th17-Zelle** T-Helfer-17-Zelle

**TNF** Tumornekrose-Faktor (*tumor necrosis factor*)

**Treg-Zelle** regulatorische T-Zelle

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vereinfachtes Schema der Entwicklung von Th17-Zellen und der T-regulatorischen Zellen .....	17
Abbildung 2: Zusammenfassung der Probenverarbeitung.....	30
Abbildung 3: Auswertungsstrategie der durchflusszytometrischen Daten: Die Lymphozyten- und T-Helfer-Zell-Population. ....	48
Abbildung 4: Auswertungsstrategie der durchflusszytometrischen Daten: Th17-Zellen definiert als CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD161 <sup>+</sup> CCR6 <sup>+</sup> -Zellen. ....	49
Abbildung 5: Auswertungsstrategie der durchflusszytometrischen Daten: Die Th17-Zellen definiert als CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> IL-17 <sup>+</sup> -Zellen. ....	50
Abbildung 6: Unterschiedliche Anteile an Th17-Zellen: Vergleich von einer Nabelschnurblutprobe und einer Probe eines erwachsenen Probanden.....	53
Abbildung 7: Stimulierbarkeit der Th17-Zellen im Nabelschnurblut in Abhängigkeit von der Reife der Neugeborenen.....	55
Abbildung 8: Anteil der nativen Th17-Zellen im Nabelschnurblut in Abhängigkeit von der Reife der Neugeborenen.....	56
Abbildung 9: Altersabhängigkeit der Th17-Zellfrequenz: Darstellung der Oberflächenfärbung. ....	57
Abbildung 10: Altersabhängigkeit der Th17-Zellfrequenz: Darstellung der intrazellulären Färbung.....	58
Abbildung 11: Korrelation der Oberflächenfärbung und der intrazellulären Färbung bei Patienten mit COPD .....	59
Abbildung 12: Negative Korrelation bei Patienten mit COPD zwischen der Lungenfunktion und dem Anteil der Th17-Zellen, welche durch die intrazelluläre Färbung registriert wurden. ....	60
Abbildung 13: Zusammenhang der relativen Expressionsrate von ROR $\gamma$ t vor Stimulation und der mittels Oberflächenfärbung ermittelten Anteile der Th17-Zellen. ....	61
Abbildung 14: Zusammenhang der relativen Expressionsrate von ROR $\gamma$ t nach Stimulation und der mittels Oberflächenfärbung ermittelten Anteile der Th17-Zellen. ....	62

Abbildung 15: Zusammenhang der relativen Expressionsrate von IL-17 und der mittels Oberflächenfärbung ermittelten Anteile der Th17-Zellen. ....	63
Abbildung 16: Die relative Expressionsrate von RORyt in der Gruppe der Neugeborenen.....	64

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung der Schweregrade der COPD .....	21
Tabelle 2: Charakterisierung der Neugeborenen .....	27
Tabelle 3: Charakterisierung der gesunden Kinder und Jugendlichen .....	28
Tabelle 4: Charakterisierung der erwachsenen Patienten und Probanden .....	29
Tabelle 5: Materialien für die Zellisolation mit Ficoll .....	31
Tabelle 6: Geräte für die Zellisolation mit Ficoll .....	32
Tabelle 7: Materialien für die Ermittlung der Zellzahl .....	33
Tabelle 8: Gerät für die Ermittlung der Zellzahl .....	33
Tabelle 9: Materialien zur Zellstimulation während einer Kurzzeit-Zellkultur .....	34
Tabelle 10: Geräte zur Zellstimulation während einer Kurzzeit-Zellkultur .....	34
Tabelle 11: Materialien zur Th17-Oberflächenzellfärbung sowie -intrazelluläre Färbung und Messung mit Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung .....	36
Tabelle 12: Geräte zur Th17-Oberflächenzellfärbung sowie -intrazelluläre Färbung und Messung mit Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung .....	37
Tabelle 13: Zusammenfassung des Färbeschemas .....	38
Tabelle 14: Materialien zur mRNA-Isolierung und Desoxyribonukleasen-Verdau .....	39
Tabelle 15: Geräte zur mRNA-Isolierung und Desoxyribonukleasen-Verdau .....	40
Tabelle 16: Materialien für die Reverse Transkription .....	41
Tabelle 17: Geräte für die Reverse Transkription .....	41
Tabelle 18: Pipettierschemas der Reversen Transkription .....	42
Tabelle 19: Materialien für die Quantitative Polymerasekettenreaktion .....	43
Tabelle 20: Geräte für die Quantitative Polymerasekettenreaktion .....	44
Tabelle 21: Verwendete Primer für ROR $\gamma$ T, GAPDH und IL-17 .....	44
Tabelle 22: Zusammenfassung zur Herstellung des Mastermixes für eine qPCR .....	44
Tabelle 23: Zusammenfassung: Temperaturschema des Thermocyclers .....	45
Tabelle 24: Materialien für die Agarose-Gelelektrophorese .....	45
Tabelle 25: Geräte für die Agarose-Gelelektrophorese .....	46
Tabelle 26: Vergleich des Mittelwertes $\pm$ Standardfehler von Proben erwachsener Probanden und Neugeborener .....	54
Tabelle 27: Patientenkollektiv: Neugeborene .....	85
Tabelle 28: Patientenkollektiv: Kinder im Alter von 4 – 17 Jahre .....	85

Tabelle 29: Pateientenkollektiv: Patienten mit COPD und gesunde Probanden .....	86
---	----

## 1. Einleitung

### 1. Einleitung

#### 1.1. Die Th17-Zellen

T-Helfer-17-Zellen (Th17-Zellen) wurden erstmals 2005 als ein T-Helfer-Zell-Subtyp neben den T-Helfer-1-Zellen (Th1-Zellen) und T-Helfer-2-Zellen (Th2-Zellen) beschrieben (Harrington, et al. 2005; Park, et al. 2005). Dabei handelt es sich um CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>-Lymphozyten (CD: „Unterscheidungsgruppe“, *cluster of differentiation*) (Kerzel, et al. 2012), die vor allem Interleukin-17 (IL-17), IL-17F und IL-22 produzieren und dadurch eine massive Gewebereaktion durch die weite Verbreitung von IL-17- und IL-22-Rezeptoren in verschiedenen Geweben auslösen können. Zur Kommunikation mit anderen Immunzellen sezernieren sie außerdem IL21. Th17-Zellen werden aufgrund der Expression von CD161 auch als Natürliche Killer-T-Zellen-ähnliche Zellen (NKT-Zellen) bezeichnet (Cosmi, et al. 2008). Darüber hinaus tragen sie den Chemokinrezeptor 6 (CCR6) auf ihrer Oberfläche, welcher bei allen IL-17-produzierenden Th-Zellen gefunden wird (Singh, et al. 2008). Die Hauptfunktion von Th17-Zellen scheint die Elimination von Pathogenen zu sein, welche weder von Th1- noch von Th2-Zellen adäquat erkannt und zerstört werden können (Tesmer, et al. 2008). Die Antigen-Rezeptoren von Th17-Zellen richten sich gegen eine Reihe von Pilz-Antigenen wie *Pneumocystis jirovecii* und *Candida albicans* sowie gegen bakterielle Antigene von *Propionibacterium acnes*, *Citrobacter rodentium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacteroides spp.*, *Borrelia spp.* und *Mycobacterium tuberculosis*. All diese Pathogene triggern eine sehr starke Th17-Antwort (Korn, et al. 2009). So konnten zum Beispiel für *Candida albicans* spezifische Gedächtnis-T-Zellen identifiziert werden, welche zu dem CCR6<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup>-Th17-Subtyp gehören. Der Hefepilz führt *in vitro* zu einer gesteigerten Th17-Antwort und *in vivo* zu einer vermehrten Produktion von IL-23 (Acosta-Rodriguez, et al. 2007b). Außerdem gelten Th17-Zellen als potente Auslöser von Gewebe-Entzündungen und scheinen an der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen, vor allem von Rheumatoider Arthritis, Psoriasis und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen beteiligt zu sein (Tesmer, et al. 2008). Des Weiteren spielen sie eine wichtige Rolle bei Asthma bronchiale und der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) (Liang, et al. 2007).

## 1. Einleitung

Th17-Zellen sind zwar die Hauptproduzenten von IL-17, jedoch können auch andere Zellen, wie CD8<sup>+</sup>-Zellen,  $\gamma\delta$ -T-Zellen, CD14<sup>+</sup>-Monozyten, *lymphoid tissue inducer* (LTi)-Zellen und NKT-ähnliche Zellen, dieses Zytokin produzieren (Lee, et al. 2012). Eine überschießende Reaktion der Th17-Zellen wird in der Regel durch die von Th1- und Th2-Zellen produzierten Zytokine IL-12, IL-4 und Interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) unterbunden (Park, et al. 2005).

### 1.1.1. Die initiale Differenzierung von naiven T-Zellen zu Th17-Zellen

Th17-Zellen sind ein unabhängiger Subtyp der T-Helferzellen, da für ihre Entwicklung eigene Differenzierungs- und Transkriptionsfaktoren existieren (Korn, et al. 2009). Im Allgemeinen stammen Th17-Zellen von CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup>-Vorläuferzellen ab (Cosmi, et al. 2008). Für die Differenzierung dieses Th-Typs sind, wie auch für die Entwicklung der anderen Th-Zelltypen, die Costimulatoren des angeborenen Immunsystems CD28 und der induzierbare T-Zell-Kostimulator (*Inducible T-cell costimulator*, ICOS) erforderlich. Jedoch ist die Differenzierung der Th17-Zellen unabhängig von Zytokinen oder Transkriptionsprogrammen, die für die Differenzierung der Th1- oder Th2-Zellen erforderlich wären (Park, et al. 2005; Harrington, et al. 2005). Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass bei der Differenzierung von Th17-Zellen zwei eigentlich gegenläufige Zytokine gleichzeitig anwesend sein müssen, zum einen der immunregulatorische transformierende Wachstumsfaktor- $\beta$  (*transforming growth factor- $\beta$* ; TGF $\beta$ ) und zum anderen das proinflammatorische IL-6 (Veldhoen, et al. 2006; Bettelli, Korn, and Kuchroo 2007). Auch IL-21 induziert, wie IL-6, gemeinsam mit TGF $\beta$  die Expression von IL-17 in naiven Th-Zellen (Korn, et al. 2007). Weil Th17-Zellen selbst die Hauptproduzenten von IL-21 sind, werden über eine positive Rückkopplung die Differenzierungsrate sowie die Vorläuferzellzahl gesteigert (Zhou, et al. 2007; Korn, et al. 2007; Nurieva, et al. 2007). Beim Menschen scheint darüber hinaus eine Kombination aus IL-1 $\beta$  und IL-6 (Acosta-Rodriguez, 2007; Wu, 2020) bzw. IL-1 $\beta$  und IL-23 (Wilson, et al. 2007) für die Differenzierung zu Th17-Zellen eine Rolle zu spielen. In neueren Studien wird anhand der zur Differenzierung nötigen Zytokine und den entsprechenden Eigenschaften der Th17-Zellen zwischen nicht pathologischen und pathologischen Th17-Zellen unterschieden. Nicht pathologische Th17-Zellen werden demnach durch IL-6 und TGF $\beta$  induziert, pathologische Th17-Zellen hingegen durch die Kombination von IL-6, IL-1 $\beta$  und IL-23 (Wu, 2020). TGF $\beta$  ist essentiell um *retinoic*

## 1. Einleitung

*acid receptor-related orphan receptor c* (RORc), das humane Homolog zu *retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma* (ROR $\gamma$ t), zu aktivieren, obwohl dessen Funktion, die Expression von IL-17 zu induzieren, durch einen Überschuss von TGF $\beta$  gehemmt wird. Nur durch die gleichzeitige Anwesenheit von IL-1 $\beta$  und IL-6, IL-23 oder IL-21 wird die Hemmung von RORc aufgehoben, sodass die T-Helfer-Zelle mit der Transkription von IL-17 beginnen kann (Manel, Unutmaz, and Littman 2008). Die initial entstandene IL-17-produzierende Th-Zelle produziert jedoch auch noch geringe Mengen an IL-10, ein antiinflammatorisches Zytokin, welches zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung noch einen Gegenspieler der proinflammatorischen Zytokine darstellt (McGeachy, et al. 2007).

### 1.1.1.1. Die Zytokine der Differenzierung von Th17-Zellen

TGF $\beta$  ist ein Zytokin, welches bei der Entwicklung und der Homöostase der Th-Zellen eine wichtige Rolle spielt (Li, Sanjabi, and Flavell 2006). Es wird von Leukozyten, z.B. Dendritischen Zellen, aber auch von Stromazellen gebildet, sodass eine Identifikation der TGF $\beta$ -Quelle *in vivo* nicht möglich ist (Korn, et al. 2009). TGF $\beta$  ist bei Mäusen essentiell für die Induktion von IL-17 in naiven CD4<sup>+</sup>-T-Zellen sowie für die Induktion des IL-23-Rezeptors, der die sich differenzierenden Zellen empfänglich für IL-23 macht und somit für deren Reifung verantwortlich ist. Andererseits hemmen hohe Konzentrationen an TGF $\beta$  die Expression des IL-23-Rezeptors (IL-23R) und damit auch die Differenzierung zu Th17-Zellen. In diesem Fall wird die Bildung von regulatorischen Th-Zellen (Treg-Zellen) gefördert. IL-22 wird erst von Th17-Zellen gebildet, wenn diese IL-23 ausgesetzt waren, weshalb die Produktion von IL-22 mit einem späten Differenzierungsgrad dieses T-Helfer-Subtyps assoziiert ist (Korn, et al. 2009). Auch beim Menschen scheint TGF $\beta$  indirekt zur Differenzierung beizutragen, indem es die inhibitorischen Zytokine IL-4 und INF $\gamma$  supprimiert (Tesmer, et al. 2008).

IL-6 wird von Zellen des angeborenen Immunsystems wie Dendritischen Zellen, Monozyten, Makrophagen, Mastzellen, B-Zellen und Untergruppen von aktivierten T-Zellen, aber auch von Tumorzellen, Endothelzellen, Fibroblasten und Keratinozyten produziert und ist ein wichtiges Zytokin von Entzündungsreaktionen. Dabei ist IL-6 ein Hepatozyten-stimulierender Faktor, welcher die Produktion der Akuten-Phase-Proteine induziert. Wichtige Induktoren von IL-6 sind IL-1, Tumornekrose-Faktor



## 1. Einleitung

(*tumor necrosis factor*; TNF), Plättchenwachstumsfaktor (*platelet derived growth factor*; PDGF), IL-3, Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierende Faktor (*granulocyte macrophage colony-stimulating factor*, GM-CSF) und IL-17 (Korn, et al. 2009). IL-6 scheint vor allem im Tiermodell eine dominante Rolle zu spielen, beim Menschen kommen diesem Zytokin eher supportive Funktionen zu, da humane naive CD4<sup>+</sup>-T-Zellen unverzüglich IL-23-Rezeptoren ausbilden und somit IL-23 beim Menschen die Hauptrolle in der Differenzierung zu Th17-Zellen zu spielen scheint (Schmitt and Ueno 2015).

TGFβ und IL-6 führen nur kombiniert zur Differenzierung von naiven T-Zellen zu Th17-Zellen, dabei fördern niedrige Konzentrationen an TGFβ die Expression des IL-23R. Die Funktion von RORγt als Transkriptionsfaktor wird jedoch durch große Mengen von TGFβ über TGFβ-induziertes *Forkhead-Box-Protein P3* (Foxp3) gehemmt (Zhou et al. 2008). Durch die Präsenz von IL-6, IL-23 oder IL-21 wird die Foxp3-vermittelte Hemmung von RORγt abgeschwächt, sodass das Transkriptionsprogramm der Th17-Zellen ablaufen kann. Dieser Vorgang scheint sowohl für die Maus als auch für den Menschen gültig zu sein (Manel, Unutmaz, and Littman 2008; Zhou, et al. 2008).

Die Hauptmenge an IL-21 wird von Th17-Zellen gebildet, geringere Mengen aber auch von Th1- und Th2-Zellen (Korn, et al. 2007; Nurieva, et al. 2007). IL-21 kann gemeinsam mit TGFβ zur Differenzierung von Th17-Zellen führen. Von sich differenzierenden Th17-Zellen gebildetes IL-21 fördert die Bildung von Th17-Vorläuferzellen und wirkt somit als Wachstums- und Differenzierungsfaktor der Th17-Zellen. IL-17 verfügt nicht über diese Eigenschaften (Korn, et al. 2009).

TGFβ + IL-6 sowie TGFβ + IL-21 induzieren die Expression von RORγt, welches benötigt wird, um die Expression des IL-23R zu triggern (Korn, et al. 2009). *In vivo* scheint aber IL-6 eine größere Rolle für die Th17-Zell-Differenzierung zu spielen als IL-21. IL-21 induziert die Differenzierung zu Th17-Zellen scheinbar nur in einer entzündungsfreien Umgebung und somit in Abwesenheit von IL-6. Daraus schlossen Korn et al., dass IL-21 eine große Rolle bei der Aufrechterhaltung und Vermehrung eines Th17-Vorläuferzell-Pools bei einem reduzierten IL-6-Angebot spielt (Korn, et al. 2007). Unter diesen beschriebenen Umständen ist IL-21 wichtig für die Th-17-Antwort (Korn, et al. 2009).

## 1. Einleitung

Auch die Leitzytokine der Th1- und Th2-Zellen, IFN $\gamma$  respektive IL-4, scheinen einen Einfluss auf die Entwicklung der Th17-Zellen zu haben, indem sie diese hemmen. Auf bereits differenzierte Th17-Zellen hat IFN $\gamma$  hingegen keinen Einfluss mehr (Harrington, et al. 2005). IL-17 hat aber auf der anderen Seite keinen Einfluss auf die Differenzierung von Th1- und Th2- Zellen (Tesmer, et al. 2008).

### 1.1.1.2. Die Transkriptionsfaktoren der Differenzierung von Th17-Zellen

Th17-Zellen exprimieren den Transkriptionsfaktor ROR $\gamma$ t, welcher für die IL-17-Produktion erforderlich ist, sowie den ihm ähnlichen ROR $\alpha$ . ROR $\gamma$ t wird allerdings als Schlüsseltranskriptionsfaktor bezeichnet, da er maßgeblich an der Expression der Th17-Zell-Zytokine beteiligt ist (Jetten 2009). Der Mechanismus, auf welche Weise diese beiden Transkriptionsfaktoren die IL-17-Produktion beeinflussen, ist noch nicht endgültig geklärt. Es gibt zwar eine potentielle ROR-Bindungsstelle am IL-17-Promotor, eine direkte Bindung von ROR $\gamma$ t an diesen Promotor ist aber nicht bewiesen (Ivanov, et al. 2006; Jetten 2009). Im Tiermodell konnte nachgewiesen werden, dass auch der Signaltransduktor und Aktivator der Transkription 3 (*signal transducer and activator of transcription 3*, STAT3) eine wichtige Rolle in der Differenzierung von Th17-Zellen spielt. In aktivierten und durch IL-23 stimulierten Th17-Zellen bindet STAT3 direkt an den IL-17-Promotor und induziert somit die Expression von IL-17. In naiven T-Zellen, die mit TGF $\beta$  und IL-6 stimuliert wurden, ist dieser Transkriptionsfaktor für die Expression von ROR $\gamma$ t erforderlich. Da ROR $\gamma$ t und STAT3 für die IL-17-Expression benötigt werden, kann davon ausgegangen werden, dass beide Transkriptionsfaktoren in einer bislang unbekannten Weise mit dem IL-17 Promotor interagieren (Tesmer, et al. 2008; Jetten 2009). Die Induktion von IL-21 durch IL-6 wird durch eine direkte Bindung von STAT3 am IL-21-Promotor ausgelöst. Hierbei scheint ROR $\gamma$ t keine Rolle zu spielen, da die IL-21-Expression bei ROR $\gamma$ t-defizienten Mäusen nicht beeinträchtigt ist. IL-21 wiederum induziert gemeinsam mit IL-6, und bei Mäusen auch mit TGF $\beta$ , die ROR $\gamma$ t- und IL-17-Expression. Im Gegensatz zu IL-21 ist die Expression des IL-23-Rezeptors stark von ROR $\gamma$ t abhängig. Bindet IL-23 an den IL-23-Rezeptor führt dies zu einem positiven Rückkopplungsmechanismus und somit zu einer weiteren Th17-Differenzierung über die Aktivierung von STAT3. IL-10 hingegen inhibiert die Differenzierung von Th17-Zellen durch die Suppression der ROR $\gamma$ t- und IL-17-Expression (Jetten 2009).

## 1. Einleitung

Neben den STAT-Transkriptionsfaktoren scheint ebenfalls der regelnde Faktor des Interferon 4 (*Interferon regulatory factor 4*, IRF4) gemeinsam mit STAT3 zu einer gesteigerten Expression von ROR $\gamma$ t zu führen und damit wichtig für die Th17-Zell-Differenzierung zu sein. Darüber hinaus ist IRF4 durch die Suppression von Foxp3 an der Balance zwischen Th17- und Treg-Zellen beteiligt (Brüstle, et al. 2007).

Neuere Studien legen jedoch nahe, dass noch weitere Kofaktoren an der Differenzierung der Th17-Zellen beteiligt sind. So scheint eine Kostimulation des Rezeptor CD5 zu einer gesteigerten Entwicklung der Th17-Zellen mit einer vermehrten Produktion von IL-17 zu führen. Auch über diesen Signalweg findet letztlich eine Aktivierung von ROR $\gamma$ t durch den gesteigerten nukleären Transport des Transkriptionsfaktors statt (McGuire, et al. 2014; de Wit, et al. 2011). Auch der Swi/Snf-Komplex wird in neueren Studien als wichtige Einheit zur Regulation von Zielgenen von ROR $\gamma$ t betrachtet und weiter untersucht (Lee, 2020).

### 1.1.2. Die Beziehung zwischen Th17-Zellen und regulatorischen Th-Zellen

Die Zusammenhänge in der Entwicklung von Th17- und Treg-Zellen sind für die Pathogenese verschiedener Erkrankungen von Bedeutung, wie am Beispiel der COPD im Folgenden genauer erläutert. Treg-Zellen sind CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-T-Zellen und werden durch die Expression von FoxP3 und ihre suppressiven Funktionen auf die Immunantwort definiert (Schmitt and Ueno 2015; Jetten 2009). Das Th17- und Treg-Zell-Entwicklungsprogramm ist gegensätzlich: Nach der T-Zell-Rezeptor-Stimulation kann eine naive T-Zelle dazu veranlasst werden, Foxp3 zu exprimieren, und wird damit in Anwesenheit von TGF $\beta$  zu einer Treg-Zelle. Sind aber TGF $\beta$  und IL-6 oder IL-21 vorhanden, ist der Treg-Zell-Entwicklungsweg aufgehoben und es entwickeln sich Th17-Zellen mit Expression des Transkriptionsfaktors ROR $\gamma$ t (Bettelli, 2006; Veldhoen, 2006; Lee, 2018). Somit scheint IL-6 die ausschlaggebende Rolle zu spielen, ob die Immunantwort von proinflammatorischen Th17-Zellen oder von protektiven Treg-Zellen dominiert wird (Bettelli, et al. 2006). Aber auch TGF $\beta$  ist ein wegweisendes Zytokin für die Eigenschaften der sich entwickelnden Zellen. Es ist für die Expression von Foxp3 und ROR $\gamma$ t erforderlich, jedoch sind die auf TGF $\beta$  folgenden Signalkaskaden unterschiedlich: Es wird zum Beispiel das Protein *SMAD Family Member 4* (Smad 4) für die Induktion von Foxp3 benötigt, für die Induktion von ROR $\gamma$ t hingegen nicht

## 1. Einleitung

(Yang, et al. 2008). Die molekulare Basis für die wechselseitige Beziehung zwischen Th17-Zellen und Treg-Zellen stellen ROR $\gamma$ t, ROR $\alpha$  und Foxp3 selbst dar, da sie die Möglichkeit besitzen, sich gegenseitig zu antagonisieren (Zhou, et al. 2008). Foxp3 bindet an ROR $\gamma$ t und hemmt dieses damit (Zhou, et al. 2008). Foxp3 muss allerdings noch einen weiteren Transkriptionsfaktor, den *Runt-related transcription factor 1* (Runx1) neben ROR $\gamma$ t binden, um eine vollständige Hemmung des Th17-Transkriptionsprogramms auszulösen. Runx1 beeinflusst die Th17-Differenzierung durch die Induktion der ROR $\gamma$ t-Expression und durch die Bindung an ROR $\gamma$ t während der IL-17-Transkription (Zhang, Meng, and Strober 2008). Außerdem scheinen weitere Zytokine in diesen Prozess involviert zu sein. So scheint IL-2 die Th17-Zell-Differenzierung im Tiermodell zu inhibieren, die Treg-Zell-Entstehung aber zu fördern (Korn, et al. 2009). Auch der Metabolit Retinsäure ist an der Regulation der Balance zwischen Th17- und Treg-Zellen beteiligt. Sie greift in den TGF $\beta$ - und den IL-6/IL-21/IL-23-Signalweg ein, was schließlich zu einer verminderten Bildung von Th17-Zellen führt. Es ist anzunehmen, dass in einer entzündlichen Umgebung die Entwicklung von Th17-Zellen eher durch Retinsäure gehemmt, als die *de novo* Entstehung von Treg-Zellen gefördert wird (Xiao, et al. 2008). Es konnte des Weiteren eine vermehrte Expression des Aryl-Hydrocarbon-Rezeptors (AHR) unter Th17-Zell-Bedingungen (IL-6 und TGF $\beta$ ) in Th17-Zellen und Treg-Zellen festgestellt werden (Hill et al. 2007; Veldhoen, et al. 2008). AHR ist ein ligandenabhängiges System, um die Entstehung von Th17-Zellen und Treg-Zellen zu kontrollieren. Dabei scheint der Signalweg ähnlich dem des TGF $\beta$  zu sein. Je nach Ligand wird die Entwicklung eines der beiden Zelltypen gefördert. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass 2,3,7,8-Tetrachlorobenzo-p-dioxin die Expression von Foxp3 induziert, wodurch dann funktionelle Treg-Zellen entstehen. 6-formylindolo[3,2-b]carbazol hingegen fördert die Bildung von Th17-Zellen (Quintana et al., 2008; Veldhoen et al., 2008). Zigarettenrauch, welcher der häufigste Auslöser für eine COPD ist, stellt einen starken Aktivator dieses Systems dar und kann somit die Differenzierung von Th17-Zellen verstärken (Veldhoen, et al. 2008; Quintana, et al. 2008; Chen, et al. 2011).

Die Differenzierung zu induzierten Treg-Zellen (iTreg-Zellen) ist allerdings nicht endgültig. Bis zu 5 Tage nach der Differenzierung ist es für diese Zellen unter TGF $\beta$  + IL-6-Einfluss möglich, zu einem Th17-Zell-Phänotyp zurückzukehren. Dabei handelt es

## 1. Einleitung

sich um einen zweistufigen Prozess, bei dem erst Foxp3 herunterreguliert werden muss und anschließend die Foxp3-Inhibition von ROR $\gamma$ t und ROR $\alpha$  aufgehoben wird. IL-6 scheint dafür ausschlaggebend zu sein. Auch natürliche Treg-Zellen (nTreg) können unter inflammatorischen Konditionen zu Th17-Zellen differenzieren (Yang, et al. 2008).

### 1.1.3. Die Zytokine der Th17-Zellen und deren Effekte

Th17-Zellen sind zwar nach ihrem Leitzytokin IL-17A, im Folgenden nur als IL-17 bezeichnet, benannt, produzieren darüber hinaus aber auch IL-17F, IL-21, IL-22, GM-CSF und wahrscheinlich TNF $\alpha$  sowie IL-6. Hierbei wirkt IL-21 vor allem auf andere Immunzellen, wie B-Zellen, und erweitert die Th17-Antwort, womit es ebenfalls zur Autoimmunität beiträgt. IL-17, IL-17F und IL-22 hingegen wirken auf verschiedene Zelltypen und induzieren in diesen die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen, um neutrophile Granulozyten zum Ort des Entzündungsgeschehens zu locken (Korn, et al. 2009).

#### 1.1.3.1. IL-17 und IL-17F

IL-17 wurde 1993 erstmals von Rouvier et al. als zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Antigen 8 (*Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 8*) beschrieben (Rouvier, et al. 1993).

Der Nachweis von IL-17 ist mit einer Reihe inflammatorischer Erkrankungen assoziiert, beispielsweise mit rheumatoider Arthritis, Asthma bronchiale, Lupus erythematodes und Allograft-Abstoßung. Der IL-17-Rezeptor ist ubiquitär in verschiedensten Geweben vorhanden und aktiviert durch Kontakt mit IL-17 den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B und Jnk Kinase-Wege (Park, et al. 2005).

Die Gene von IL-17 und IL-17F liegen beim Menschen auf Chromosom 6, während die Gene der anderen Mitglieder der IL-17-Familie auf verschiedenen Chromosomen liegen. Da IL-17 und IL-17F von Zellen des angeborenen sowie des adaptiven Immunsystems gebildet werden, stellen diese Zytokine eine Verbindung zwischen den beiden Bereichen des humanen Immunsystems her. Sie haben proinflammatorische Eigenschaften und bewirken bei verschiedenen Zelltypen eine Induktion der Expression von Zytokinen (TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6, GM-CSF, G-CSF), Chemokinen (*chemokine (C-X-C motif) ligand 1, 8, 10*) und Metalloproteinasen (Korn, et al. 2009). Außerdem

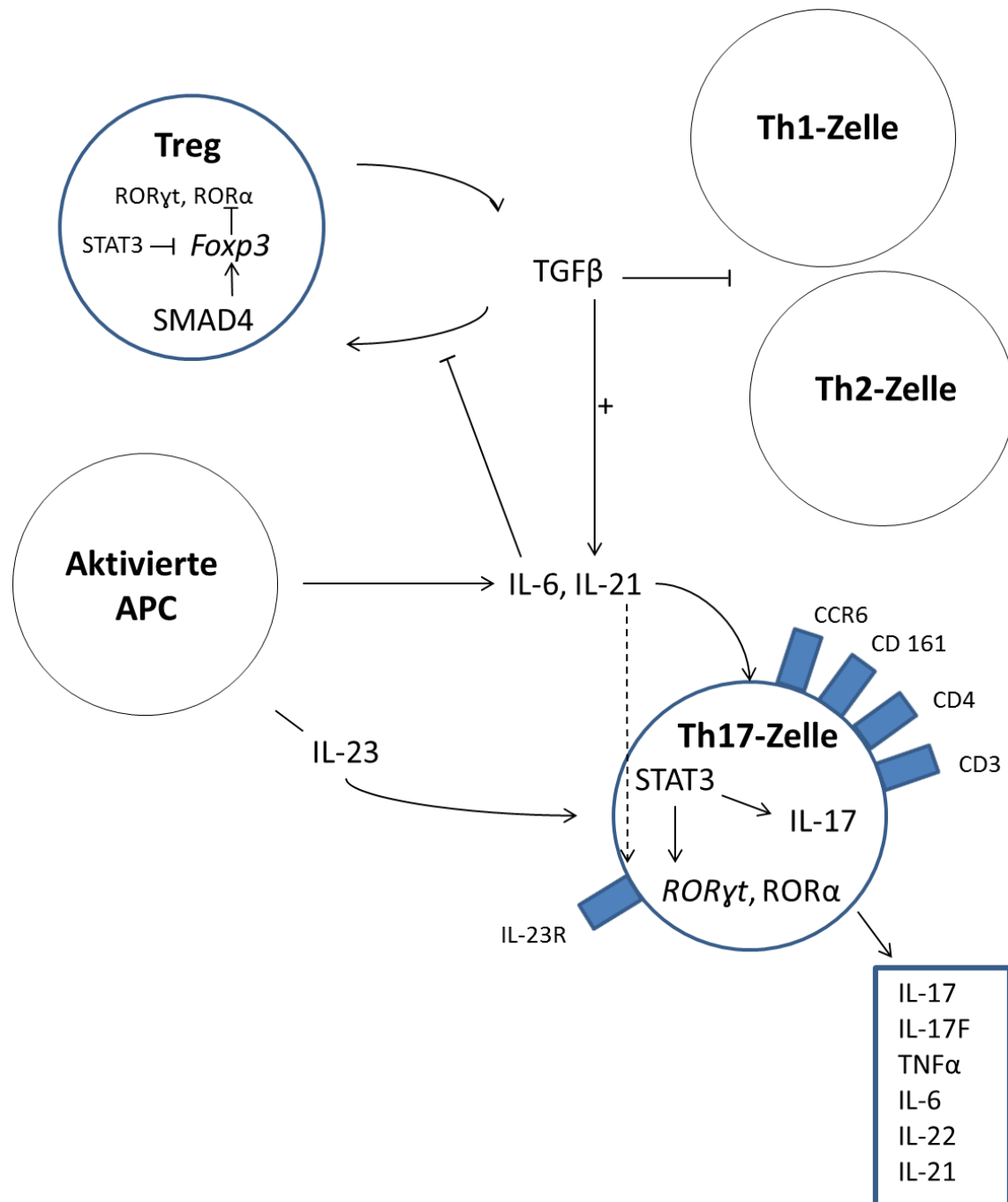
## 1. Einleitung

fördert IL-17 die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten über die Induktion des Granulozyten-Kolonie-stimulierenden Faktors (*Granulocyte-Colony Stimulating Factor*, G-CSF) und IL-8 (Park, et al. 2005). Dabei scheint IL-17 im Gegensatz zu IL-17F jedoch der potentere Faktor der Neutrophilen-Rekrutierung zu sein (Liang, et al. 2007). IL-17 induziert außerdem in neutrophilen Granulozyten CCL20, ein Chemokin, welches den einzigen Liganden des CCR6 darstellt und sowohl antimikrobielle als auch chemoattraktive Funktionen besitzt. Insgesamt bildet die Interaktion von CCL20 und CCR6 eine positive Rückkopplung, die eine proinflammatorische Th17-Zell-Antwort fortführt. CCL20 wird ebenfalls von Th17-Zellen gebildet (Wilson, et al. 2007; Hoover, et al. 2002).

### 1.1.4. Übersicht und Zusammenfassung der Differenzierung von Th17-Zellen und Treg-Zellen

Die folgende Abbildung (Abbildung 1) veranschaulicht vereinfacht die ablaufenden Signalkaskaden bei der Differenzierung der Th17- und Treg-Zellen. Nach der T-Zell-Rezeptor-Stimulation kann eine naive T-Zelle dazu veranlasst werden, Foxp3 zu exprimieren und wird somit in Anwesenheit von TGF $\beta$  zu einer Treg-Zelle. Sind zusätzlich IL-6 oder IL-21 vorhanden, ist der Treg-Zell-Entwicklungsweg aufgehoben und es entwickeln sich Th17-Zellen, die den Transkriptionsfaktor ROR $\gamma$ t und die für Th17-Zellen typischen Zytokine exprimieren. TGF $\beta$  ist für die Expression von Foxp3 und ROR $\gamma$ t erforderlich, jedoch unterscheiden sich in Treg- und Th17-Zellen die auf TGF $\beta$  folgenden Signalkaskaden: Für die Induktion von Foxp3 wird Smad4 benötigt, für die Induktion von ROR $\gamma$ t hingegen nicht. Die proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-21 induzieren zusätzlich in der Th17-Zelle den IL-23-Rezeptor, welcher zur weiteren Differenzierung der Zelle benötigt wird.

## 1. Einleitung



**Abbildung 1: Vereinfachtes Schema der Entwicklung von Th17-Zellen und der T-regulatorischen Zellen modifiziert nach Ivanov et al., 2006**

APC: Antigen-präsentierende Zelle (*antigen presenting cell*); CCR6: Chemokinrezeptor 6; CD: „Unterscheidungsgruppe“ (*cluster of differentiation*); Foxp3: Forkhead-Box-Protein P3; IL-17, 21, 22, 23: Interleukin-17, 21, 22, 23; IL-23-R: IL-23-Rezeptor;  $ROR\alpha$ : *retinoic acid receptor-related orphan receptor alpha*;  $ROR\gamma t$ : *retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma*; Smad4: *SMAD Family Member 4*; STAT3: Signaltransduktor und Aktivator der Transkription 3 (*signal transducer and activator of transcription 3*); TCR: T-Zell-Rezeptor (*T-cell-receptor*);  $TGF\beta$ : Transformierender Wachstumsfaktor  $\beta$  (*transforming growth factor  $\beta$* ); Th-Zelle: T-Helfer-Zelle; Th1-Zelle: T-Helfer-1-Zelle; Th2-Zelle: T-Helfer-2-Zelle; Th17-Zelle: T-Helfer-17-Zelle; TNF: Tumornekrose-Faktor (*tumor necrosis factor*); Treg-Zelle: regulatorische T-Zelle (Ivanov et al., 2006; Kerzel et al., 2012; Manel et al., 2008; Nurieva et al., 2007; Yang et al., 2008a; Yang et al., 2008b; Zhou et al., 2008)

## 1. Einleitung

### 1.2. Die Entwicklung des Immunsystems und die Rolle der Th17-Zellen bei Neugeborenen

#### 1.2.1. Die Entwicklung des Immunsystems in der Embryonal- und Fetalperiode

Die erste Hämatopoese des Embryos und somit auch die Entwicklung des Immunsystems beginnt im Mesoderm des Dottersacks und im extraembryonalen Mesenchym.

Der erste nachweisbare Zelltyp in der embryonalen Zirkulation sind Monozyten beziehungsweise Makrophagen. Sie können bereits in der 4.-6. Gestationswoche im Dottersack und Mesenchym sowie ab der 5. Woche in der prähämatopoetischen Leber nachgewiesen werden (Forestier, 1991). Funktionelle Populationen von Monozyten/Makrophagen konnten jedoch bisher erst im Nabelschnurblut nachgewiesen werden, wobei Menge und Funktionalität abhängig von der Reife der Neugeborenen waren (Serushago, 1996). Im Vergleich zu adulten Zellen werden aber geringere Mengen an Zytokinen, vor allem  $\text{TNF}\alpha$ , produziert, was trotz ähnlicher Phagozytoseleistung zu einer verminderten Chemotaxis führt (Serushago, 1996, Weston, 1977). Die Antigen-präsentierenden Langerhans-Zellen wandern bereits im ersten Trimenon der Schwangerschaft in die Epidermis ein und ähneln schon im zweiten Trimenon dem adulten Phänotyp dieser Zellen, allerdings sind sie geringere Stimulatoren von Lymphozyten-Reaktionen (Foster, 1986).

Prothymozyten können ab der 7. Entwicklungswoche in der Leber nachgewiesen werden. Sie bilden die Oberflächenmerkmale CD7 und CD45 aus, sowie CD3 im Zytoplasma, aber noch nicht auf der Zellmembran. CD3 kann erst in der 10. Schwangerschaftswoche auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden.  $\text{CD7}^+$ -T-Zell-Vorläufer bilden in der 8.-9. Woche mit weiteren Gewebezellen den Thymus. In der Milz finden sich schließlich ab der 18. Entwicklungswoche T-Zellen (Haynes, 1989; Haynes, 1988). Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass die Milz zu diesem Zeitpunkt bereits vollständig immunkompetent ist. Eine Immunreaktion ist jedoch trotzdem durch die eingeschränkte Funktionsfähigkeit der Antigen-präsentierenden Zellen vermindert. Eine weitere Auffälligkeit zeigt sich im Vergleich der  $\text{CD45RO}^+$ -T-Gedächtniszellen: bei Neugeborenen können nur geringe Mengen dieses T-Zell-Typs in Blut und Milz festgestellt werden, wohingegen die Hälfte aller T-Zellen im adulten



## 1. Einleitung

Gewebe diesem Phänotyp entspricht. Wahrscheinlich ist der Intestinaltrakt neben dem Thymus an der Differenzierung von T-Zellen beteiligt. In der humanen intestinalen Mukosa sind T-Zellen ab 12.-14. Woche der Entwicklung nachweisbar. Erste CD3<sup>+</sup>-T-Zellen finden sich jedoch erst nach 15-16 Wochen im Blut des Feten (Holt and Jones 2000).

Das maternale Immunsystem muss den Fetus als „*Allograft*“ während der Schwangerschaft akzeptieren. Besteht ein Defekt in der Immunregulation der Schwangeren, so kann es zum Abort, zur Präeklampsie oder zu einer Frühgeburt kommen. In diesen Fällen ist vor allem eine starke Th1-Antwort und eine vermehrte IFN $\gamma$ -Ausschüttung zu finden, welche stark plazentatoxisch wirken (Holt and Jones 2000). Auch der Fetus muss *in utero* sein Immunsystem herunterregulieren um zu überleben, dies geschieht durch eine Drosslung der Immunantwort gegen Antigene durch die Expression von verschiedenen immunregulatorischen Zytokinen wie IL-4, IL-5 und IL-10. IL-4 und IL-5 werden dabei vor allem von Th2-Zellen produziert. Diese Zytokine werden ebenfalls neben Prostaglandin E2 und Progesteron von der Plazenta gebildet, was zu einer verminderten Th1-Antwort an der mütterlich-kindlichen Verbindungsstelle führt (Holt and Jones 2000).

### 1.2.2. Das Immunsystem in der Neonatalperiode und die Rolle der Th17-Zellen beim Neugeborenen

Im Allgemeinen ist bei Neugeborenen im Vergleich zu Erwachsenen die Th1-Antwort durch eine verminderte Produktion Th1-typischer Zytokine und durch eine geringere Antwort neonataler Makrophagen auf die Stimulation durch IFN $\gamma$  verringert. Außerdem nimmt durch geringere Konzentration an IFN $\gamma$  die zelluläre Zytotoxizität der NK-Zellen ab (Holt and Jones 2000). Diese Sachverhalte tragen dazu bei, dass es zu einer scheinbar verminderten zellulären Abwehr bei Neugeborenen kommt, welche in Richtung der Th2-Zellen verschoben ist (Schelonka, et al. 2011). Nach der Geburt muss das Immunsystem an allen Körperoberflächen Mikroorganismen erkennen und bekämpfen. Dies geschieht durch eine Verschiebung von der fetalen Th2-Dominanz zu einer postnatalen pro-inflammatorischen Th1/Th17-Dominanz. Während einer Infektion ist eine rasche pro-inflammatorische Immunantwort von großer Bedeutung, um Pathogene zu bekämpfen. Es konnte gezeigt werden, dass bei Frühgeborenen mit

## 1. Einleitung

geringen IL-17-Spiegeln diese Abwehr reduziert war und ein erhöhtes Infektionsrisiko bestand (Schelonka, et al. 2011). Im Vergleich zum mütterlichen Blut konnten im Nabelschnurblut von Reifgeborenen höhere Konzentrationen an inflammatorischen Zytokinen, mit Ausnahme von  $\text{TNF}\alpha$ , festgestellt werden. Auch hier konnte eine Verschiebung zur Th2-Antwort gezeigt werden (Herberth, et al. 2011).

Black et al. konnten zeigen, dass naive  $\text{CD4}^+$ -Zellen von Früh- und Reifgeborenen unter polarisierenden Bedingungen, also in dem für die Differenzierung nötigen Zytokinmilieu, in größeren Mengen zu IL-17-produzierenden Zellen wurden als adulte naive  $\text{CD4}^+$ -Zellen (Black, et al. 2012). In anderen Studien konnte keine Polarisation von adulten naiven Th17-Zellen ohne das Oberflächenmerkmal CD45RO nachgewiesen werden (Cosmi, et al. 2008). Es konnte beobachtet werden, dass naive  $\text{CD4}^+$ -Zellen von Neugeborenen insgesamt eher zu einer Th17-Antwort und nicht wie die adulten Zellen zu einer Th-1-Antwort tendierten. Auf molekulargenetischer Ebene konnte gezeigt werden, dass es bei Früh- und Reifgeborenen eine bedeutend stärkere Expression von den wichtigen Th-17-Zell-Genen IL-23R, STAT3 und ROR $\gamma$ t gab. Bei Frühgeborenen konnten sich des Weiteren nicht nur  $\text{CD161}^+$ - sondern auch  $\text{CD161}^-$ -Zellen in Th17-Zellen differenzieren, was bei Reifgeborenen nicht der Fall war (Black, et al. 2012). Cosmi et al. vermuten, dass größere Mengen an Th17-Zell-Vorläufern im Nabelschnurblut im Vergleich zu adultem Blut zu finden sind. Diese Vermutung stützt sich darauf, dass diese bereits im Verlauf frühzeitig in das Gewebe wandern und dort im weiteren Leben zu IL-17-produzierenden Zellen differenzieren (Cosmi, et al. 2008). Beim Erwachsenen finden sich nur wenige  $\text{CD4}^+\text{CD161}^+$ -Th-Zellen, deren Mehrheit das Oberflächenmerkmal CD45RO ausbildet, was für deren Funktion als Gedächtniszelle spricht (Cosmi, et al. 2008).

### 1.3. COPD und Th17-Zellen

#### 1.3.1. Die Definition und Pathogenese der COPD

Die chronische obstruktive Lungenerkrankung (*Chronic obstructive pulmonary disease*, COPD) ist nach Definition der *Global Initiative For Chronic Obstructive Lung Disease* (GOLD) eine progrediente Lungenerkrankung, welche durch eine chronische,

## 1. Einleitung

nicht vollständig reversible Obstruktion der Atemwege charakterisiert wird und mit einer ungewöhnlichen inflammatorischen Reaktion der Lunge auf exogene Noxen assoziiert ist. Die Erkrankung geht in der Regel mit abnormer Kurzatmigkeit und einer verlängerten forcierten Ausatmung einher. Die Einteilung der Erkrankung in verschiedene Schweregrade erfolgt nach der GOLD anhand des spirometrischen Wertes der Einsekundenkapazität (FeV1) und nach aktuellen Leitlinien nach Vogelmeier et al. 2017 auch anhand von klinischen Gesichtspunkten, wie in Tabelle 1 dargestellt. So fließen zusätzlich zu den spirometrischen Daten auch die Anzahl der Exazerbationen, deren Schwere und die erreichten Werte in Evaluationsinstrumenten wie dem *Modified British Medical Research Council* (mMRC) und dem *COPD Assessment Test* (CAT) in die Bestimmung des Schweregrades ein (Rabe, et al. 2007)

**Tabelle 1: Einteilung der Schweregrade der COPD anhand spirometrisch-erhobener Werte nach Vogelmeier et al. 2007 und der Einteilung mittels *British Medical Research Council* (mMRC) und dem *COPD Assessment Test* (CAT) nach Vogelmeier et al. 2017 (Vogelmeier, et al. 2007).**

Tiffenau-Index (FeV1/VC) < 0,7			
	mMRC 0 – 1 CAT < 10	mMRC > 2 CAT ≥ 10	
0 – 1 Exazerbation im letzten Jahr (ohne Hospitalisierung)	A	B	FeV1 % Soll GOLD 1: ≥ 80 GOLD 2: 50 - 79
> 2 Exazerbationen im letzten Jahr oder ≥ 1 Exazerbation im letzten Jahr, die zur Hospitalisierung führte	C	D	FeV1 % Soll GOLD 3: 30 - 49 GOLD 4: < 30

Die COPD zeichnet sich durch eine konstante Entzündung der Atemwege sowie durch eine fortschreitende alveoläre Destruktion bis zum Emphysem aus (Kurimoto, et al. 2013). Sie ist derzeit weltweit einer der häufigsten Gründe für Morbidität und Mortalität und wird 2020 wahrscheinlich die dritt-häufigste Todesursache sein

## 1. Einleitung

(Caramori, et al. 2014). Eine chronisch obstruktive Lungenerkrankung resultiert aus zwei pathologischen Prozessen. Zum einen kommt es zum fibrotischen Umbau des Gewebes (*Remodeling*) und damit zur Verengung der kleinen Atemwege, des Weiteren wird das Lungenparenchym zerstört. Diese Prozesse sind mit einer chronischen Entzündung in der Lungenperipherie assoziiert (Hogg and Timens 2009). In der Lunge von Rauchern werden reichlich Proteasen wie Matrix-Metalloproteinasen (MMP) 9, MMP 12 und neutrophilen Elastasen von Makrophagen und Neutrophilen gebildet (Atkinson, et al. 2011; Hautamaki, et al. 1997; Shapiro, et al. 2003; Voss, et al. 2015; Chen, et al. 2011). Voss et al. konnten jedoch für die MMP-9 im Mausmodell nachweisen, dass diese nicht an der Entstehung eines Zigarettenrauch-induzierten Emphysems beteiligt ist (Voss, et al. 2015).

Von Th1-Zellen produziertes IFN $\gamma$  fördert indirekt über ein 10 kDa großes Protein (IP-10; CXCL 10) und Interferon induzierte Monokine (*monokine induced by interferon*, MIG) die Expression von MMP 12 in Lungengewebsmakrophagen, welche schließlich zur Inaktivierung von  $\alpha$ 1-Antitrypsin führt (Grumelli, et al. 2004). Ebenso wirkt IL-17, welches zusätzlich die Produktion von CCL20 in Lungenmakrophagen induziert und dadurch zu einem Anstieg der antigenpräsentierenden Zellen (*antigen presenting cell*, APCs), vor allem dendritischer Zellen, in der Lunge führt (Shan, et al. 2009; Shan, et al. 2012). APCs spielen eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen und exprimieren, durch die Th1- und Th17-Zytokine angeregt, vermehrt Osteopontin. Osteopontin ist ein Zytokin, welches bislang mit Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht wurde und vermutlich zur Differenzierung von Th17-Zellen beiträgt und bei Mäusen auch zum Emphysem führt (Shan, et al. 2012). Außerdem kann IL-17 Atemwegsepithelien zur Produktion von MMP 9, MMP 12 und Mukus anregen und ist für die Einwanderung von neutrophilen Granulozyten in das Lungengewebe und deren vermehrte Bildung im Knochenmark verantwortlich (Chen, et al. 2003; Oda, et al. 2005; Liang, et al. 2007; Chen, et al. 2011; Jones and Chan 2002). Die Produktion von MMP 12 scheint dabei indirekt über den *chemokine (C-X-C motif) ligand 10* (CXCL 10) durch IL-17 beeinflusst zu werden und unterbindet schließlich die protektive Funktion von  $\alpha$ 1-Antitrypsin. IL-17 kann des Weiteren neben einem Neutrophilen-Recruitment über CCL2 auch Makrophagen zum Ort des entzündlichen Prozesses locken (Chen, et al. 2011; Shan, et al. 2009). Eine

## 1. Einleitung

weitere wichtige Rolle scheint, wie in einem Tiermodell beschrieben, IL-22 in der Pathogenese zu spielen, indem es in Anwesenheit von IL-17 synergistisch zu diesem wirkt und somit die Entzündung der Atemwege verstärkt (Sonnenberg, et al. 2010). Auch IL-23, welches vermehrt im Lungengewebe von COPD-Patienten nachgewiesen werden konnte, scheint an der Entwicklung und dem Fortschreiten einer COPD beteiligt zu sein (Di Stefano, et al. 2009).

IL-17 produzierende Zellen sind bei COPD in den Atemwegen (Di Stefano, et al. 2009; Eustace, et al. 2011) und im peripheren Blut erhöht (Vargas-Rojas, et al. 2011). Eustace et al. zeigten des Weiteren, dass mehr IL-17 als IL-17F in der subepithelialen Region der kleinen Atemwege zu finden ist. Die IL-17- und IL-17F-Produktion war regional im Lymphfollikel unterschiedlich aktiviert: IL-17<sup>+</sup>-T-Zellen finden sich vermehrt in der Peripherie, wohingegen IL-17F<sup>+</sup>-T-Zellen auch zusätzlich in der B-Zell-Zone vorkommen (Eustace, et al. 2011). Im Tiermodell konnte eine positive Korrelation zwischen der IL-17-Konzentration im Lungengewebe und der Menge von neutrophilen Granulozyten in der aus einer Bronchoalveolären-Lavage (BAL) gewonnenen Flüssigkeit festgestellt werden. Zusätzlich korrelierte im Mausmodell die Konzentration an IL-17 in der BAL und im Lungengewebe mit dem Grad der glatten Muskelzellproliferation (Shen, et al. 2004). Diese beiden Beobachtungen könnten einen Teil der Pathogenese der entzündlichen und obstruktiven Komponente der COPD erklären. Auch in der bronchialen Submukosa und im Subepithelium ist die Produktion von IL-17 bei Patienten mit einer COPD in größeren Mengen nachweisbar (Di Stefano, et al. 2009; Eustace, et al. 2011). IL-17 akkumuliert und aktiviert auch neutrophile Granulozyten, die in der entzündlichen Pathogenese der COPD ebenfalls eine entscheidende Rolle spielen (Oda, et al. 2005). Diese Prozesse werden über die Freisetzung von Neutrophilen-rekrutierenden Zytokinen aus Epithelzellen, Atemwegsfibroblasten und glatten Muskelzellen durch IL-17 vermittelt (Jones and Chan 2002). Außerdem steigern IL-17 und IL-17F die Expression der Mucin-Gene in Bronchialepithelzellen. Dabei scheint IL-17F jedoch nur in den kleinen Atemwegen zu einer Becherzellhyperplasie zu führen (Oda, et al. 2005).

IL-17 ist ein potenter Induktor der IL-6- und IL-11-Produktion in Fibroblasten, wodurch es indirekt über diese beiden Interleukine an dem *airway remodeling* beteiligt ist

## 1. Einleitung

(Molet, et al. 2001). IL-6 sowie IL-17 können die Mukusproduktion durch Induktion von Muc5AC- und Muc5B-Genen steigern, welche vorrangig für die übermäßige Schleimproduktion in der menschlichen Lunge verantwortlich sind. Da IL-17 Atemwegsepithelzellen zur Produktion von IL-6 anregen kann, findet somit eine Verstärkung der Wirkung auf die Muzin-Produktion statt (Chen, et al. 2003).

### 1.3.2. Der Einfluss von Zigarettenrauch auf die Pathogenese der COPD

Haupttrisikofaktor für die Entwicklung einer chronischen obstruktiven Lungenerkrankung ist das Zigarettenrauchen (Silverman and Speizer 1996). Der inhalative Tabak-Konsum löst in der Lunge eine inflammatorische Antwort aus, welche bei Patienten erhöht ist, die im Verlauf eine COPD ausbilden. Diese entzündliche Reaktion besteht nach der Beendigung des Rauchens fort, woraus Domagala-Kulawik schloss, dass COPD-Patienten über eine irreguläre Immunregulation verfügen könnten (Domagala-Kulawik 2008). Bei COPD-Patienten, die niemals geraucht haben, scheinen Umweltfaktoren wie die Belastung durch die Kohle- und Biomassebrennstoff-Nutzung eine Rolle zu spielen (Salvi and Barnes 2009).

*In vitro* und *in vivo* konnte gezeigt werden, dass Zigarettenrauch lediglich einen unterstützenden Effekt auf die Th17-Zell-Differenzierung über den Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor besitzt (Chen, et al. 2011). Dem gegenüber stehen jedoch die Ergebnisse einer Studie im Mausmodell, wo zusätzlich eine Induktion von Th1-Zellen gezeigt werden konnte (Harrison, et al. 2008). Aus diesem Grund kann im peripheren Blut von COPD-Patienten vor allem eine Erhöhung von INF $\gamma$  als Zytokin der Th1-Zellen nachgewiesen werden, wohingegen keine Änderung des Th2-Zytokins IL-13 im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe festgestellt werden konnte (Lee, et al. 2007). Eine COPD kann in einem Lungenemphysem enden, welches einer destruktiven Überblähung der Alveolen entspricht. Durch Zigarettenrauch wird IL-18 induziert und aktiviert, das vermutlich die Induktion einer Th17-Zell-Antwort fördert. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass IL-18 ein Emphysem sowie eine zytotoxische Antwort über einen INF $\gamma$ -abhängigen Mechanismus induziert. Dieses Interleukin bewirkt aber ebenfalls über IL-17 und IL-13 eine fibrotische Atemwegsumwandlung, eine Becherzell-Metaplasie sowie eine Intimahyperplasie der Lungengefäße (Kang, et al. 2012). Allerdings konnte im Mausmodell gezeigt werden,

## 1. Einleitung

dass IL-17 kein durch Zigarettenrauch induziertes Emphysem auslöst, sondern lediglich an der Regulation der Expression von proinflammatorischen Mediatoren beteiligt ist. Damit sehen Voss et al. die Hauptfunktion von IL-17 in der mikrobiell getriggerten Inflammation während der akuten Exazerbation einer COPD (Voss, et al. 2015).

Vagas-Rojas et al. konnten einen Anstieg von proinflammatorischen T-Zellen, Th1- und Th17-Zellen sowie der regulatorischen T-Zellen bei gesunden Rauchern und bei Patienten mit COPD feststellen. Diese unterschiedlichen Zelltypen steigen parallel zueinander an, wahrscheinlich wird so die Th1/Th17-Antwort Treg-vermittelt kontrolliert. Bei Patienten, die im Verlauf eine chronisch obstruktive Lungenerkrankung entwickeln, scheint diese Kontrolle defekt zu sein oder deren Immunsystem ist durch die Persistenz des antigenen Stimulus überfordert (Vargas-Rojas, et al. 2011). Der Anstieg der Treg-Zellen steht in Relation zur Langzeitexposition von Zigarettenrauch, nicht aber zur Atemwegsobstruktion (Smyth et al. 2007).

Nach Vagas-Rojas kann es nach der Exposition von Zigarettenrauch je nach Individuum zu folgenden Reaktionen kommen:

1. Das Rauchen fördert über eine Entzündungsreaktion mit Produktion von IL-6 durch Dendritische Zellen die Differenzierung von naiven T-Zellen zu proinflammatorischen Th1- und Th17-Zellen. Kompensatorisch nimmt auch die Menge der Treg-Zellen zu, um die proinflammatorische Antwort zu kontrollieren. Dieses entzündliche Stadium kann dann über das gesamte Leben des Rauchers persistieren, löst aber, obwohl es mit verschiedenen Erkrankungen und dem Lungenkarzinom assoziiert ist, kein Krankheitsbild wie das der COPD aus.

2. Zu Beginn ist die immunregulatorische Balance von anfälligen Personen trotz Inflammation noch erhalten. Es kommt schließlich zur COPD, wenn entweder die Effektor-T-Zellen eine Resistenz zur Regulation aufweisen oder ein intrinsischer Fehler in den Treg-Zellen vorliegt. Letztlich führt dies zur unkontrollierten Proliferation der Th17-Zellen, die dann wiederum in den autoimmunen, inflammatorischen Prozess involviert sind (Vargas-Rojas, et al. 2011).

Bei akut exazerbierter COPD ist das Verhältnis von Th17-Zellen zu Treg-Zellen zugunsten der inflammatorischen Immunantwort verschoben, wohingegen bei einer

## 1. Einleitung

stabilen COPD die Menge der Treg-Zellen dominiert (Li, Pan, and Qiu 2014). Zusammenfassend zeigt sich, dass anscheinend Th17-, Th1- und Th2-Zellen gleichermaßen eine wichtige Rolle bei der Entstehung einer chronisch obstruktiven Lungenerkrankung und des daraus folgenden Lungenemphysems spielen (Kurimoto, et al. 2013).

### 1.4. Fragestellung

Mit dieser Promotionsarbeit sollte untersucht werden, wie sich die Th17-Zell-Zahl während der Ontogenese und bei der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung entwickeln. Dafür wurden Blutproben mit unterschiedlichen Methoden auf den Anteil der Th17-Zellen an den insgesamt zirkulierenden Th-Zellen untersucht, um die folgenden Fragen zu beantworten:

- Können Th17-Zellen bereits beim Neugeborenen nachgewiesen werden?
- Wenn Th17-Zellen nachgewiesen werden können, ist dann auch eine Stimulierbarkeit dieser Zellen zur Produktion von IL-17 gegeben?
- Besteht ein Unterschied in den Anteilen der Th17-Zellen an der Th-Zell-Population zwischen Neugeborenen, Kindern und Erwachsenen und kann eine altersabhängige Zunahme des Anteils der Th17-Zellen beobachtet werden?
- Können Unterschiede in den Anteilen der Th17-Zellen an Th-Zellen zwischen den Proben gesunder Probanden und COPD-Patienten gezeigt werden?
- Kann ein Zusammenhang zwischen dem Schweregrad der COPD (als Marker gilt hier die Lungenfunktion) und dem Anteil an Th17-Zellen dargestellt werden?
- Zeigen sich Zusammenhänge zum Alter und zum Schweregrad einer COPD auch auf Transkriptionsebene von Th17-Zellen?
- Stimmen die Ergebnisse aus den durchflusszytometrischen Daten mit den Expressionsraten von ROR $\gamma$ t und IL-17 in der quantitativen PCR überein?



## 2. Material und Methoden

### 2.1. Patienten und Probanden

#### 2.1.1. Neugeborene

Es wurden insgesamt 17 Nabelschnurblutproben von Neugeborenen im Zeitraum vom 14.03.2014 bis 23.05.2014 untersucht. Die Charakteristika der Neugeborenen sind in Tabelle 2 dargestellt. Es wurden nur Proben von Neugeborenen mit bis zur Geburt unauffälligem Schwangerschaftsverlauf in die Studie eingeschlossen. Neugeborene mit dem Verdacht auf eine Infektion wurden ausgeschlossen.

Für diese Untersuchung lag ein positives Votum der Ethikkommission des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg vor (Adendum 2 zum Projekt „Dynamik des B-Zell-Repertoires bei Allergien im Kindesalter“, Az 24/07). Vor der Abnahme des Blutes wurden die Eltern über die Studie aufgeklärt und um ihre Einwilligung gebeten.

**Tabelle 2: Charakterisierung der Neugeborenen**

Neugeborene	Charakteristika
Anzahl; n	<b>17</b>
Weiblich; n (%)	<b>11 (65 %)</b>
Gestationsalter; Wochen+Tage Median (Streuung)	<b>37+6 (29+0 – 41+1)</b>

#### 2.1.2. Gesunde Kinder und Jugendliche

Bei dieser Gruppe handelt es sich um insgesamt 21 Kinder und Jugendliche, die weder eine allergische oder immunologische Grunderkrankung noch eine positive Familienanamnese einer entsprechenden Erkrankung aufwiesen. Die Daten wurden durch Theresa Schindler in ihrer Dissertation „Die TH17-Immunantwort von Kindern und Jugendlichen mit Asthma bronchiale“ in dem Zeitraum vom 05.07.2013 bis 22.12.2014 erhoben. Für die Erhebung wurden die gleichen Protokolle, Reagenzien, Geräte und Auswertestrategien genutzt wie in der vorliegenden Arbeit, so dass eine Vergleichbarkeit gegeben ist.

## 2. Material und Methoden

Tabelle 3 zeigt eine Charakterisierung dieser Gruppe.

Auch für diese Probanden wurde nach entsprechender Aufklärung die Einwilligung der Sorgeberechtigten vor der Untersuchung eingeholt. Auch für diese Gruppe lag ein positives Votum der Ethikkommission des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg vor (Adendum 2 zum Projekt „Dynamik des B-Zell-Repertoires bei Allergien im Kindesalter“, Az 24/07).

**Tabelle 3: Charakterisierung der gesunden Kinder und Jugendlichen**

Kinder und Jugendliche (4 – 17 Jahre)	Charakteristika
Anzahl; n	<b>21</b>
Weiblich; n (%)	<b>15 (71)</b>
Alter; Jahre Median (Streuung)	<b>10 <sup>10</sup>/<sub>12</sub> (14 <sup>11</sup>/<sub>12</sub> - 5 <sup>8</sup>/<sub>12</sub>)</b>

### 2.1.3. Erwachsene

Zur Untersuchung des Anteils der Th17-Zellen an der Th-Zellpopulation bei Erwachsenen wurden 13 gesunde Probanden und 13 COPD-Patienten untersucht (Tab. 4). Es wurden Patienten mit diagnostizierter COPD unabhängig von anderen Faktoren eingeschlossen, sowie gesunde Personen ohne anamnestischen Hinweis auf Allergien und chronische Erkrankungen.

Die Blutproben waren im Rahmen der pneumologischen Studie 13-08COVOC nach entsprechender Aufklärung und mit Einverständnis in der Klinik für Innere Medizin mit Schwerpunkt Pneumologie am Universitätsklinikum Marburg (Direktor: Prof. Dr. C. Vogelmeier, AG Koczulla/Greulich) entnommen worden. Auch für diese Gruppe lag ein positives Votum der Ethikkommission des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg vor (Az 179/12).

## 2. Material und Methoden

**Tabelle 4: Charakterisierung der erwachsenen Patienten und Probanden**

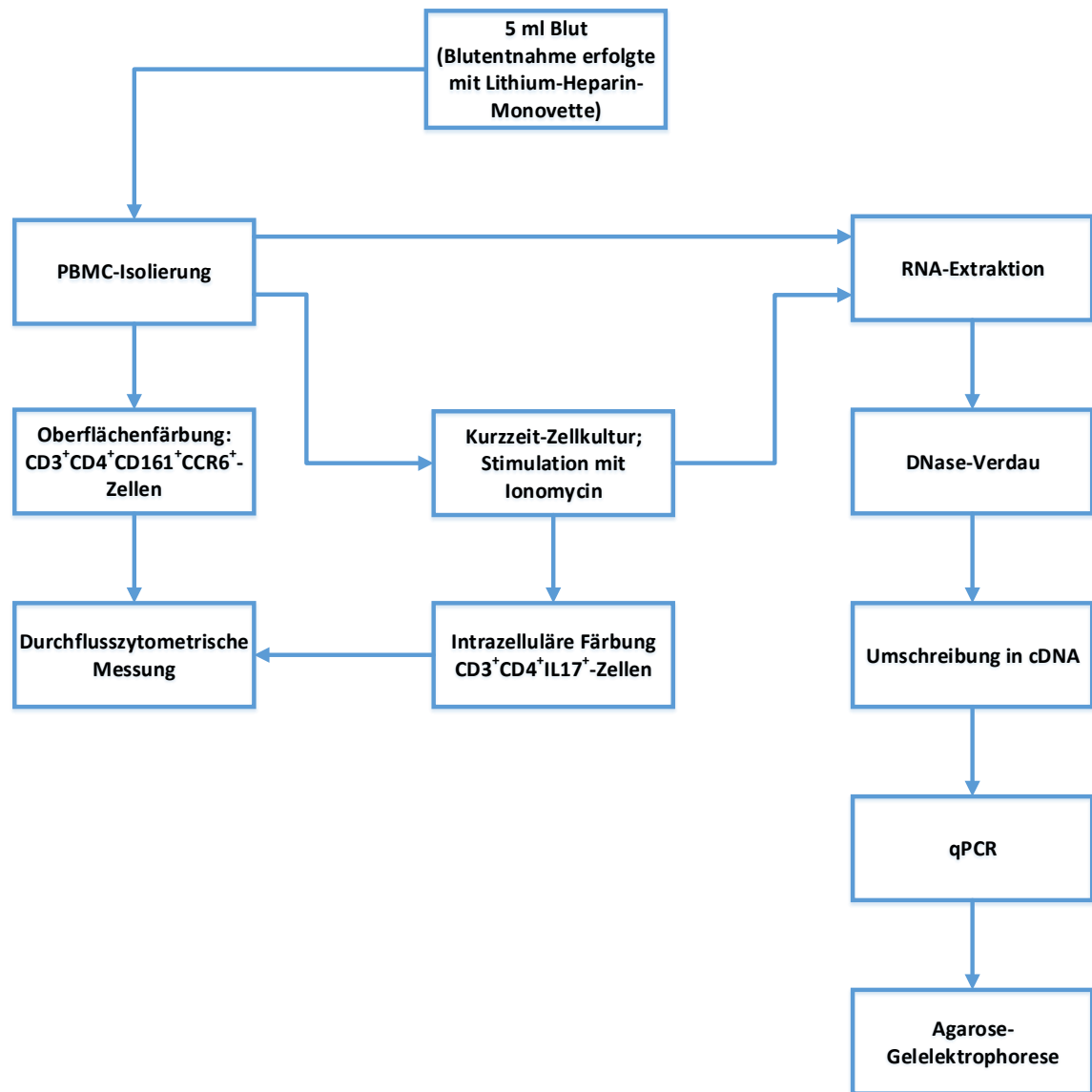
Erwachsene	Patienten mit COPD	Gesunde Probanden
Anzahl; n	<b>13</b>	<b>13</b>
Weiblich; n (%)	<b>2 (15)</b>	<b>10 (77)</b>
Alter; Jahre Median (Streuung)	<b>73 (54 – 76)</b>	<b>23 (22 – 33)</b>
(Ex-) Raucher; n (%)	<b>12 (92)</b>	<b>1 (7)</b>
FeV1 (% Ist) Mittelwert ± Standardfehler	<b>59,55 ± 3,39</b>	
FeV1/FVC (%) Mittelwert ± Standardfehler	<b>67,96 ± 4,29</b>	

FeV1 = Einsekundenkapazität; FVC = forcierten Vitalkapazität; FeV1/FVC (%) = Tiffeneau-Index

### 2.2. Probensammlung und -verarbeitung

Die folgende Graphik (Abbildung 2) zeigt schematisch eine Zusammenfassung der Probenverarbeitung von der Blutentnahme über die Isolierung der mononukleären Zellen des peripheren Blutes (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs) bis zur durchflusszytometrischen Messung beziehungsweise Gen-Analyse. Nach der PBMC-Isolierung wurde ein Teil der Zellen mittels Oberflächenfärbung und der andere Teil nach Kurzzeitstimulation mit Ionomycin auch intrazellulär gefärbt und darauf durchflusszytometrisch untersucht. Zusätzlich wurde RNA jeweils aus den PBMCs vor und nach Kurzzeitstimulation extrahiert und nach Umschreibung in cDNA mittels PCR weiter untersucht.

## 2. Material und Methoden



**Abbildung 2: Zusammenfassung der Probenverarbeitung**

CCR6: Chemokinrezeptor 6; CD: „Unterscheidungsgruppe“ (cluster of differentiation); cDNA: Komplementäre DNA (complementary desoxyribonucleinacid); DNase: Desoxyribonukleïnase; IL-17: Interleukin-17; RNA: Ribonukleinsäure (ribonucleinacid); PBMC: Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (peripheral blood mononuclear cells); qPCR: Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (quantitative polymerase chain reaction)

## 2. Material und Methoden

### 2.3. Zellisolation mit Ficoll

Um die PBMCs zu isolieren, wurden 3 ml des Separationsmediums Ficoll in ein Leukosep-Röhrchen gegeben und ca. 30 s bei Raumtemperatur und 1000 g zentrifugiert. Danach wurde das Blut vorsichtig am Rand entlang in das Röhrchen gegeben, darauf folgte eine weitere Zentrifugation ohne Bremse bei 1000 g für 10 min. Die Interphase, mit den enthaltenen Th17-Zellen wurde mit Hilfe einer Pasteurpipette abgenommen und in ein 15 ml Flacon-Röhrchen überführt. Das Plasma wurde abgenommen und bei -80 °C für weitere Zytokin-Untersuchungen eingefroren. Die verwendeten Materialien und Geräte sind in den Tabellen 5 und 6 aufgelistet.

**Tabelle 5: Materialien für die Zellisolation mit Ficoll**

Material	Handelsname	Hersteller
12 ml Falcon mit Trennscheibe	<i>Leucosep™, sterile</i>	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
15 ml Falcon-Röhrchen	<i>Cellstar Tubes 15 ml</i>	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Zellsieb	<i>50 µm Syringe Filcons Non Sterile</i>	BD Biosciences, San Jose, USA
Trennungslösung	<i>Lymphocyte-Separationsmedium</i>	PAA, Pasching, Österreich
Waschlösung	<i>Dulbecco's PBS (1x) without Ca &amp; Mg, Sterile</i>	PAA, Pasching, Österreich
Einmalpasteurpipette	Serumpipette steril	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland

## 2. Material und Methoden

<i>Eppendorf-Tube 1,5 ml</i>	<i>Eppendorf-Tube 1,5 ml; Reaktionsgefäß 38x10</i>	Eppendorf, Wesseling- Berzdorf, Deutschland
------------------------------	--	--

**Tabelle 6: Geräte für die Zellisolation mit Ficoll**

Gerät	Handelsname	Hersteller
Zentrifuge	Varifuge 3.ORS	Heraeus, Hanau, Deutschland
Sterile Werkbank	MSC Advanced	Thermo Fisher Scientific, Nidderau, Deutschland

### 2.4. Ermittlung der Zellzahl

Die isolierten Zellen aus 2.2. wurden mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) bis zur 12 ml Marke aufgefüllt und bei 900 g für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurde die PBS oberhalb des entstandenen Pellets abgekippt und dieses wiederum in 750 µl PBS aufgenommen und dann durch das zuvor mit 100 µl PBS gespülte Zellsieb gegeben. Von der entstandenen Lösung wurden 10 µl abgenommen und eine 1:10 Verdünnung hergestellt, von welcher 10 µl mit 10 µl Trypanblau gefärbt wurden. Nach dem Auftragen auf eine Zählkammer, wurden die Zellen von zwei großen Quadraten (je 1 µl) ausgezählt und der Mittelwert gebildet und wie folgt die Zellzahl in der Zellsuspension errechnet:

→ Mittelwert/ 0,1 µl x  $10^4$  = Zellzahl/ ml der verdünnten Lösung

→ Einberechnung der vorherigen Verdünnungen von 1:10 und 1:2:

Mittelwert/ml x 2 x 10 = Zellzahl/ ml in der Zellsuspension

→ zusammengefasst: Mittelwert x 2 x  $10^5$  = Zellzahl/ ml in der Zellsuspension.

Die verwendeten Materialien und Geräte sind in den Tabellen 7 und 8 aufgelistet.

## 2. Material und Methoden

**Tabelle 7: Materialien für die Ermittlung der Zellzahl**

Material	Handelsname	Hersteller
Zählkammer	<i>C-Chip: Disposable Hemocytometer, Neubauer Improved DHC-NO1</i>	NanoEnTek, Massachusetts, USA
Trypanblau-Lösung	-	Fulka Analytical, SIGMA ALDRICH CHEMIE, Steinheim, Deutschland

**Tabelle 8: Gerät für die Ermittlung der Zellzahl**

Gerät	Handelsname	Hersteller
Lichtmikroskop	-	Optech, Optical Technology, Deutschland

### 2.5. Zellstimulation während einer Kurzzeit-Zellkultur

Die aus der Zellisolation gewonnenen PBMCs wurden wiederum in PBS aufgenommen und bei 90 g 10 min zentrifugiert, danach abgekippt. Zu den PBMCs wurden 500 µl X-vivo 15 ohne Zusätze gegeben und so ca. 2,5 – 3 Mio. Zellen in ein Well gegeben und ausgesät. Des Weiteren wurde 1 µl Ionomycin (Endkonzentration von 1 µg/ml) in das Well hinzugegeben. Danach erfolgt eine Inkubation von 3 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>.

Nach der dreistündigen Stimulation wurden 0,5 µl Brefeldin A in das Well gegeben, es folgte eine weitere Stunde Bebrütung bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>.

Der Well-Inhalt wurde schließlich in ein 15 ml Tube überführt und das Well mit 500 µl X-Vivo gespült und dann ebenfalls in das Tube überführt. Von der Suspension wurden erneut 10 µl für eine Zell-Zählung nach der Stimulation abgenommen, nach

## 2. Material und Methoden

bereits beschriebenem Schema verdünnt und ausgezählt. Die verwendeten Materialien und Geräte sind in den Tabellen 9 und 10 aufgelistet.

**Tabelle 9: Materialien zur Zellstimulation während einer Kurzzeit-Zellkultur**

Material	Handelsname	Hersteller
Nährmedium	<i>x-vivo 15 w/o Gentamycin and Phenol Red</i>	Lonza, Verviers, Belgien
12-Well-Platte	<i>12-Well-Suspension- Culture-Plate</i>	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Ionomycin	<i>Ionomycin calcium salt</i>	SIGMA ALDRICH CHEMIE, Steinheim, Deutschland
Brefeldin A	<i>Brefeldin A Solution</i>	eBioscience, San Diego, USA

**Tabelle 10: Geräte zur Zellstimulation während einer Kurzzeit-Zellkultur**

Gerät	Handelsname	Hersteller
Sterile Werkbank	<i>MSC Advanced</i>	Thermo Fisher Scientific, Nidderau, Deutschland
Brutschrank	BBD 6220	Heraeus, Hanau, Deutschland



## 2. Material und Methoden

### 2.6. Th17-Oberflächenzellfärbung sowie -intrazelluläre Färbung und Messung mit Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung

Die Zellsuspension nach der Stimulation wurde für 10 min bei 900 g bei 20 °C zentrifugiert. Danach wurde der Überstand zur späteren Zytokinbestimmung bei -80 °C eingefroren. Das entstandene Pellet wurde in 1 ml PBS aufgenommen und 100 µl der Suspension für die RNA-Isolierung abgenommen. Daraufhin wurden die Zellen auf 1 ml mit einem Waschmedium in ein FACS-Röhrchen aufgenommen. Nach 5 min Zentrifugation bei 350 g wurde der Überstand abgekippt und je 2 µl pro Oberflächenantikörper hinzugegeben. Es wurden Antikörper gegen folgende Oberflächenmerkmale bei der „CCR6-Färbung“ eingesetzt: Anti-CD3-FITC, -CD161-PE, -CD4-PerCP, -CCR6-APC. Außerdem wurde eine intrazelluläre Färbung mit dem Schema Anti-CD3-FITC, -CD4-PE, -IL-17-APC (intrazellulär) genutzt.

Nach Zugabe der an verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelten Oberflächenantikörper wurde die Suspension 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Verbliebene Erythrozyten wurden daraufhin durch die Zugabe von 2 ml FACS-Lysing-Solution lysiert. Es erfolgte eine weitere Inkubation von 10 min im Dunklen bei Raumtemperatur und eine Zentrifugation für 5 min bei 350 g. Der Überstand wurde abgekippt und die Zellen in 2 ml *CellWash* gewaschen. Der CCR6-Einzelfärbeansatz wurde in 300 µl *CellWash* aufgenommen und bis zur durchflusszytometrischen Messung kühl aufbewahrt. Die Zellen für den IL-17-Färbeansatz wurden in 300 µl Fixation Buffer aufgenommen, um die Zellen zu fixieren. Nach einer Inkubation in Dunkelheit von 10 min bei Raumtemperatur erfolgen zwei Waschschrte. Darauf wurden die Zellen in 200 µl *Permeabilisation Buffer* aufgenommen, welcher die Permeabilität der Zellmembran erhöht und ermöglicht, dass die nun zugegebenen 5 µl IL-17-Antikörper an ihr spezifisches intrazelluläres Antigen binden konnten. Nach einer weiteren 30-minütigen Inkubation im Dunkeln und bei Raumtemperatur sowie nach zwei weiteren Waschschrten wurde die Messung mittels FACS durchgeführt. Die verwendeten Materialien und Geräte sind in den Tabellen 11 und 12 aufgelistet. Zusätzlich zeigt Tabelle 13 nochmals eine Zusammenfassung des Färbeschemas.

## 2. Material und Methoden

**Tabelle 11: Materialien zur Th17-Oberflächenzellfärbung sowie -intrazelluläre Färbung und Messung mit Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung**

Material	Handelsname	Hersteller
FACS-Röhrchen	<i>Flow Cytometry Röhrchen</i>	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Waschlösung	<i>CellWash</i>	BD Biosciences, San Jose, USA
Lysierungslösung	<i>FACS™ Lysing Solution</i>	BD Biosciences, San Jose, USA
Fixations- und Permeabilisationspuffer	<i>Flow Cytometry Fixation and Permeabilisation Buffer Kit I</i>	R&D Systems, Minneapolis, USA
Anti-CD3-Oberflächenantikörper	Name: <i>monoclonal anti-human CD3ε-Fluorescein</i>	R&D Systems, Minneapolis, USA
	Antikörper: Maus-IgG <sub>1</sub> monoklonal	
	Klon: UCHT1	
Anti-CD4-Oberflächenantikörper	Name: <i>monoclonal anti-human-CD4-PerCP</i>	R&D Systems, Minneapolis, USA
	Antikörper: Maus-IgG <sub>2A</sub> monoklonal	
	Klon: 11830	
Anti-IL-17-intrazellulärer Antikörper	Name: <i>anti-human IL-17-Allophycocyanin Monoclonal Antibody</i>	R&D Systems, Minneapolis, USA
	Antikörper: Maus IgG <sub>1</sub> monoklonal	

## 2. Material und Methoden

	Klon: 41802	
Anti-CD161- Oberflächenantikörper	Name: <i>PE Mouse anti-human CD161</i>	BD Biosciences, San Jose, USA
	Antikörper: Maus-IgG <sub>1</sub> monoklonal	
	Klon: DX12	
Anti-CCR6- Oberflächenantikörper	Name: <i>Alexa Fluor® 647 anti-human CD196 (CCR6)</i>	Biolegend, Fell, Deutschland
	Antikörper: Maus-IgG <sub>2B</sub> monoklonal	
	Klon: TG7/ CCR6	
Anti-CD19- Oberflächenantikörper	Name: <i>APC Mouse anti-human CD19</i>	BD Biosciences, San Jose, USA
	Antikörper: Maus-IgG <sub>1</sub> monoklonal	
	Klon: SJ25C1	

**Tabelle 12: Geräte zur Th17-Oberflächenzellfärbung sowie -intrazelluläre Färbung und Messung mit Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung**

Gerät	Handelsname	Hersteller
Zentrifuge	<i>Centrifuge 5810R</i>	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Durchflusszytometer	<i>FACSCalibur</i>	BD Biosciences, San Jose, USA

## 2. Material und Methoden

**Tabelle 13: Zusammenfassung des Färbeschemas**

	FITC	PE	PerCP	APC
Negativkontrolle				
FITC-Kompensation	2µl Anti-CD3			
PE-Kompensation		2µl Anti-CD4		
PerCP-Kompensation			2µl Anti-CD4	
APC-Kompensation				2µl Anti-CD19
Th17-Oberflächenfärbung	2µl Anti-CD3	2µl Anti-CD161	2µl Anti-CD4	2µl Anti-CCR6
Intrazelluläre Th17-Färbung	2µl Anti-CD3	2µl Anti-CD4		5µl Anti-IL-17 (intrazellulär)

FITC: Fluoreszeinisothiocyanat, PE: Phycoerythrin, PerCP: Peridinin-Chlorophyll-Protein-Komplex, APC: Allophycocyanin

### 2.7. mRNA-Isolierung und Desoxyribonukleinsäse (DNase)-Verdau

Die Boten-Ribonukleinsäure (*messenger ribonucleinacid*, mRNA)-Isolierung erfolgte nach der Single-Step-Methode nach Chomczynski und Sacchi (Chomczynski, 1987). Dafür wurden Zellen vor der Stimulation aus der Zellisolation und Zellen nach der Kurzzeit-Zellkultur in je 1000 µl TriFast aufgenommen.

Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden 150 µl Chloroform hinzugegeben, nach weiterer 10-minütiger Inkubation erfolgte eine Zentrifugation von 15 min bei 13000 rpm und 4 °C. Danach waren drei Phasen erkennbar: die oberste wässrige Phase enthielt die Ribonukleinsäure (RNA), die Interphase die Desoxyribonukleinsäure (*desoxyribonucleinacid*, DNA) und die untere Phenolphase die denaturierten Proteine.

## 2. Material und Methoden

Die RNA-haltige Phase wurde abgenommen und nach Zugabe von 500 µl Isopropanol zum Fällern der RNA 20 min auf Eis gestellt und anschließend 10 min bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Darauf wurde das Pellet zweimal mit 1 ml 75 %igem Ethanol gewaschen (Zentrifugation: je 10 min bei 13000 rpm und 4 °C). Durch Antrocknen des Pellet wurde die RNA von dem Ethanol getrennt und dann in 20 – 50 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen. Nach einer Inkubation von 15 min bei 55 °C im Heizblock erfolgt der DNase-Verdau. Dafür wurden 1 µl 10x-Puffer und 1 µl DNase I zur Probe gegeben, nach einer 15-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur schloss sich die Zugabe von 2 µl Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) an. Die verwendeten Materialien und Geräte sind in den Tabellen 14 und 15 aufgelistet.

**Tabelle 14: Materialien zur mRNA-Isolierung und Desoxyribonukleasenase (DNase)-Verdau**

Material	Handelsname	Hersteller
Waschlösung	<i>Dulbecco's PBS (1x) without Ca &amp; Mg, Sterile</i>	PAA, Pasching, Österreich
RNA-Isolierungssystem	<i>peqGOLD TriFast™</i>	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Chloroform	Trichlormethan/Chloroform Rotipuran®>99%, p.a.)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol	2-Propanol	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Ribonukleasenase-freies Wasser (RNase-freies Wasser)	<i>Water, Mol Bio grade DNase-, RNase-, and Protease-free</i>	5 PRIME, Hamburg, Deutschland
DNase-Kit	<i>Desoxyribonuclease I, Amplification Grade</i> Komponenten: DNase I, Amp Grade, 10x DNase I	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland

## 2. Material und Methoden

	Reaction Buffer, 25mM EDTA (pH 8,0)	
--	--	--

**Tabelle 15: Geräte zur mRNA-Isolierung und Desoxyribonukleasenase(DNase)-Verdau**

Gerät	Handelsname	Hersteller
Zentrifuge	<i>Centrifuge 5810R</i>	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Thermoschüttler	-	HLC by DITABIS, Pforzheim, Deutschland
Tischzentrifuge	<i>Minifuge</i>	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Spektrophotometer	<i>NanoDrop 2000c</i>	Thermo Fisher Scientific, Nidderau, Deutschland

### 2.8. Reverse Transkription

Für die Reverse Transkription wurde ein Mastermix (n+1) aus 10 µl RNase-freies Wasser, 2 µl 10x RT-Puffer, 2 µl dNTPs (Mix), 2 µl Oligo-dTPrimer, 1 µl Ribolock und 1 µl Omniscript RT hergestellt. Daraufhin wurden 18 µl des Mastermixes mit 2 µl der umzuschreibenden RNA gemischt und eine Stunde bei 37 °C im Heizblock inkubiert. Danach folgte eine weitere Inkubation von 5 min bei 95 °C. Nach kurzem Abkühlen auf Eis konnte die komplementäre DNA (*complementary desoxyribonucleic acid*, cDNA) dann bei -20 °C eingefroren werden. Die verwendeten Materialien und Geräte sind in den Tabellen 16 und 17 aufgelistet. Zusätzlich zeigt Tabelle 18 das Pipettierschemas der Reversen Transkription.

## 2. Material und Methoden

**Tabelle 16: Materialien für die Reverse Transkription**

Material	Handelsname	Hersteller
DNA-Umschreibe-Kit	<i>Omniscript® R Kit</i>  Komponenten: 10x Buffer RT, dNTP mix (5mM each dNTP), Omniscript Reverse Transcriptase  Nicht verwendet: Oligo dT Primer, RNase-Inhibitor	QIAGEN, Hilden, Deutschland
Primer	Oligo(dT) <sub>18</sub> primer	Thermo Fisher Scientific, Nidderau, Deutschland
RNase-Inhibitor	RiboLock RNase-Inhibitor	Thermo Fisher Scientific, Nidderau, Deutschland
RNase-freies Wasser	<i>Water, Mol Bio grade DNase-, RNase-, and Protease-free</i>	5 PRIME, Hamburg, Deutschland

**Tabelle 17: Geräte für die Reverse Transkription**

Gerät	Handelsname	Hersteller
Thermoschüttler	-	HLC by DITABIS, Pforzheim, Deutschland
Tischzentrifuge	<i>Minifuge</i>	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Spektrophotometer	<i>NanoDrop 2000c</i>	Thermo Fisher Scientific, Nidderau, Deutschland

## 2. Material und Methoden

**Tabelle 18: Pipettierschemas der Reversen Transkription**

Reagenzien	für n=1 (Mastermix: n+1)
RNase-freies Wasser	10 µl
RT-Puffer	2 µl
sNTPs	2 µl
Oligo-dT Primer	2 µl
Ribolock	1 µl
Ribolock Reverse Transkriptase	1 µl

### 2.9. Quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR)

Für die qPCR der hergestellten cDNA wurde ein Mikroliter der zu untersuchenden cDNA (Konzentration von 1000 ng/µl) in 4,7 µl SybrGreen Advanced, welches die taq-Polymerase, Desoxyribonukleosidtriphosphate, Puffer und  $Mg^{2+}$  enthält sowie 4,2 µl RNase-freies Wasser und 0,1 µl Primermix gegeben.

Der Primermix bestand aus einer 1:10 Verdünnung von 100 pmol/µl auf 10 pmol/µl von vorwärts- und rückwärts-Primer. Die verwendeten Materialien und Geräte sind in den Tabellen 19 und 20 aufgelistet. Zusätzlich zeigt Tabelle 21 die verwendeten Primer für RORγT, GAPDH und IL-17.

Die cDNA mit den bereits beschriebenen Zusätzen wurde dann in die Vertiefungen der Platte gegeben, worauf mit Hilfe des Thermocyclers IQ5 die PCR sowie die Messungen durchgeführt werden konnten.

Folgende Schritte wurden durch den Thermocycler automatisch durchgeführt:

1. Denaturierung bei 95 °C: führt zu einer Auftrennung der DNA-Stränge
2. Hybridisierung (*Annealing*) bei 57 °C: Anlagerung der Primer



## 2. Material und Methoden

3. Elongation bei 72 °C: die Polymerase synthetisiert den DNA-Strang vom 3'Ende des Primers aus.

Diese Schritte wurden durch den Thermocycler 40-mal wiederholt. Bei der qPCR erfolgte eine direkte Analyse der Amplifikate, welche durch den Interkalator SyberGreen durch das Gerät detektiert werden können, außerdem wird von den Thermocycler eine Schmelzkurve (61x bis 95 °C) erstellt. Die Auswertung konnte dann im Anschluss mit Hilfe der Schmelzkurven erfolgen. Tabelle 22 fasst die Herstellung des Mastermixes für eine qPCR und Tabelle 23 das Temperaturschema des Thermocyclers zusammen.

**Tabelle 19: Materialien für die Quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR)**

Material	Handelsname	Hersteller
RNase-freies Wasser	<i>Water, Mol Bio grade DNase-, RNase-, and Protease-free</i>	5 PRIME, Hamburg, Deutschland
Fluorochrom	<i>SsoAdvanced™ SYBR® Green Supermix</i>	Biorad Laboratories, München, Deutschland
96-well-Platte	<i>Hard-Shell® Full-Height 96-Well Semi-Skirted PCR Plates</i>	Biorad Laboratories, München, Deutschland
GAPDH-Primer	5'-ACATCGCTCAGACACCATG-3' 5'-TGAAGGGGTCATTGATGGC-3'	Eurofins MWG Synthesis, Ebersberg, Deutschland
RORyT-Primer	5'-GCCTTTCATCATCATCTCTGC-3' 5'-GAAGATCTGCAGCCTTCCA-3'	Eurofins MWG Synthesis, Ebersberg, Deutschland
IL-17-Primer	5'-CCCCAGTTGATTGGAAGAAA-3' 5'-TTCGTGGGATTGTGATTCCT-3'	Eurofins MWG Synthesis, Ebersberg, Deutschland

## 2. Material und Methoden

**Tabelle 20: Geräte für die Quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR)**

Gerät	Handelsname	Hersteller
Tischzentrifuge	<i>Minifuge</i>	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Real Time PCR-Gerät	<i>iQ™5 Multicolor Real Time PCR Detector System</i>	Biorad Laboratories, München, Deutschland

**Tabelle 21: Verwendete Primer für ROR $\gamma$ T, GAPDH und IL-17**

	Vorwärts-Primer	Rückwärts-Primer
ROR $\gamma$ T	5'-GCCTTTCATCATCTCTGC-3'	5'-GAAGATCTGCAGCCTTTCCA-3'
GAPDH	5'-ACATCGCTCAGACACCATG-3'	5'-TGAAGGGGTCATTGATGGC-3'
IL 17	5'-CCCCAGTTGATTGGAAGAAA-3'	5'-TTCGTGGGATTGTGATTCCT-3'

**Tabelle 22: Zusammenfassung zur Herstellung des Mastermixes für eine qPCR**

	für n=1 (Mastermix: n+ 2 Wasser + 2)
SYBR Green	5 $\mu$ l
RNase-freies Wasser	3,9 $\mu$ l
Primermix (10 pmol/ $\mu$ l)	0,1 $\mu$ l

## 2. Material und Methoden

**Tabelle 23: Zusammenfassung: Temperaturschema des Thermocyclers**

Schritt	Zeit	Temperatur	Wiederholungen	Prozess
1	3 min	95 °C	1	Polymerasenaktivierung
2	10 s	95 °C	40	Denaturierung
	25 s	60 °C		Primeranlagerung und DNA-Synthese
	20 s	72 °C		Messung
3	15 s	65 °C	61	Schmelzkurve

### 2.10. Gelelektrophorese

Für das Gel wurden 1,5 g Agarose mit 100 ml TAE 1x Puffer (TRIS-Acetat-EDTA-Puffer) gemischt und bis zum Aufklaren der Flüssigkeit erhitzt. Nach der Zugabe von 7 µl GelRED wurde das noch flüssige Gel in eine Kammer gegeben und 30 min erstarren gelassen. Das fertige Gel wurde in die Laufkammer gelegt und mit TEA 1x-Puffer vollständig bedeckt. In die Wells der PCR-Platte wurden je 4 µl Loading-Buffer gegeben. Als Marker für die Länge der DNA-Amplifikate wurden 14 µl des Ladder, in die erste Tasche des Gels pipettiert. In die folgenden Taschen wurden je 14 µl der zu testenden DNA gegeben und darauf eine Spannung von 130 V über 45 min angelegt. Danach konnte das Gel mit Hilfe einer UV-Lampe betrachtet und abfotografiert werden, wodurch die einzelnen Banden durch die Färbung mit GelRED sichtbar wurden. Die verwendeten Materialien und Geräte sind in den Tabellen 24 und 25 aufgelistet.

**Tabelle 24: Materialien für die Agarose-Gelelektrophorese**

Material	Handelsname	Hersteller
Agarose	-	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Deutschland

## 2. Material und Methoden

Basen-Standard	<i>50 Base-Pair Ladder</i>	Amersham, Braunschweig, Deutschland
Ladepuffer	<i>6x Orange Loading Dye Solution</i>	Fermentas, St.-Leon-Rot, Deutschland
TBE-Puffer	TRIS-Base	Thermo Fisher Scientific, Nidderau, Deutschland
	Borsäure	Thermo Fisher Scientific, Nidderau, Deutschland
	EDTA-Na <sub>2</sub>	SIGMA ALDRICH CHEMIE, Steinheim, Deutschland
	0,001% Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
	GelRed™	Biotium Inc., Fremont, USA

**Tabelle 25: Geräte für die Agarose-Gelelektrophorese**

Gerät	Handelsname	Hersteller
Gelkammer	-	Owl, Portsmouth, USA
Spannungsquelle	E143	Consort, Turnhout, Belgien
Fotoeinheit	06 133390	Vilber Lourmat, Eberhardzell, Deutschland
Zentrifuge	<i>Centrifuge 5417R</i>	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

## 2. Material und Methoden

### **2.11. Lungenfunktionstestung**

Die Daten zur Lungenfunktionstestung der COPD-Patienten wurden im Rahmen der Untersuchungen der AG Koczulla/Greulich erhoben. Als Parameter der Obstruktion wurde dabei die Einsekundenkapazität (FeV1) bestimmt. Dabei handelt es sich um das spirometrisch gemessene maximale forcierte Ausatemvolumen in einer Sekunde. (Yoshimi, 2007)

## 2. Material und Methoden

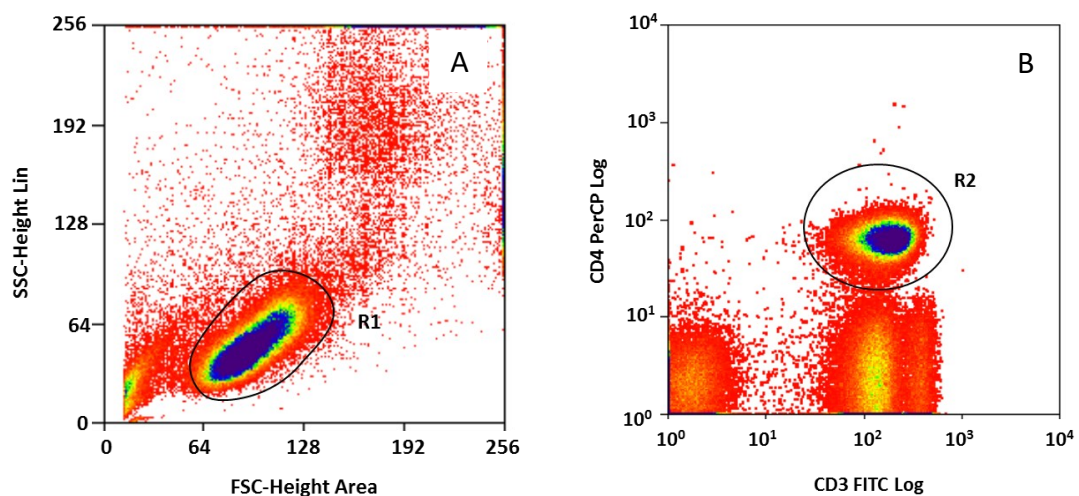
### 2.12. Auswertung

#### 2.12.1. Auswertung der Oberflächenfärbungen und der intrazellulär gefärbten Zellen

Die Auswertung der mittels Durchflusszytometrie und des Programms Cellquest Pro (BD Biosciences, San Jose, USA) erhobenen Daten erfolgte mit SummitV4.3.02 Build 2451 (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland).

Die durchgeführten Schritte werden im Folgenden beispielhaft anhand der Zellpopulation eines gesunden erwachsenen Probanden erklärt.

Zunächst wurden alle durch das Gerät registrierten Zellen im *Forward*- (FSC) und *Side-Scatter* (SSC) dargestellt. Daraufhin wurde die Lymphozytenpopulation durch ein Gate abgegrenzt (R1, Abb. 3A). Aus dieser Population wurden anschließend alle CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Zellen dargestellt (R2, Abb. 3B).



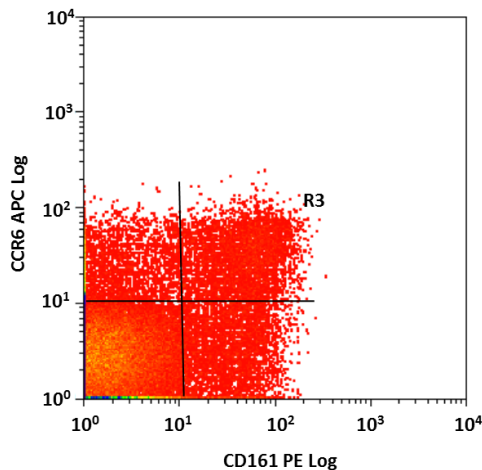
**Abbildung 3: Auswertungsstrategie der durchflusszytometrischen Daten: Die Lymphozyten- und T-Helfer-Zell-Population.**

A: Darstellung der Lymphozytenpopulation (R1) im Forward- (FSC) und Side-Scatter (SSC). B: Bestimmung der Th-Zellen (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Zellen) aus der Lymphozytenpopulation und den Oberflächenmerkmalen CD3 und CD4

## 2. Material und Methoden

### Auswertung der Oberflächenfärbung:

Um die weiteren zuvor definierten Oberflächenmerkmale mit einzubeziehen, wurden alle  $CD161^{+}$ - und  $CCR6^{+}$ -Zellen auf die Lymphozytenpopulation sowie die  $CD3^{+}CD4^{+}$ -Zellen bezogen. Von der nun dargestellten Population (R3, Abb. 4) kann davon ausgegangen werden, dass es sich um Th 17-Zellen handelt, wie von Kerzel et al. 2012 als  $CD3^{+}CD4^{+}CD161^{+}CCR6^{+}$ -Lymphozyten definiert (Kerzel et al. 2012).



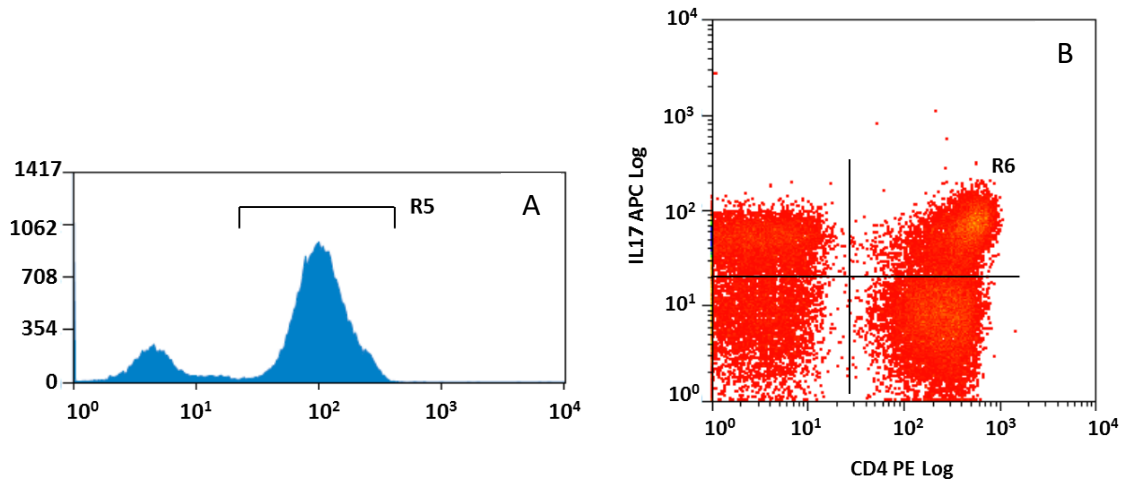
**Abbildung 4: Auswertungsstrategie der durchflusszytometrischen Daten: Th17-Zellen definiert als  $CD3^{+}CD4^{+}CD161^{+}CCR6^{+}$ -Zellen.**

In R3 sind die Th-Zellen mit den Oberflächenmerkmalen CD161 und CCR6 dargestellt.

### Intrazelluläre Färbung:

Nachdem die  $CD3^{+}CD4^{+}$ -Zellpopulation (R2, Abb. 3B) dargestellt wurde, wurden in einem Histogramm nochmals alle  $CD3^{+}$ -Zellen auf diese Lymphozytenpopulation bezogen (R5, Abb. 5A). Anschließend wurden alle  $CD4^{+}$ - und  $IL-17^{+}$ -Zellen dargestellt (R6, Abb. 5B) und erneut auf die Lymphozytenpopulation und die  $CD3^{+}$ -Zellen gegatet. Auch bei dieser letztlich gezeigten Population kann man davon ausgehen, dass es sich um die IL-17-produzierenden Th17-Zellen handelt. Diesen Sachverhalt zeigt das Histogramm, in dem der Anteil der  $IL-17^{+}$ -Zellen unter Beachtung des Lymphozyten- und des  $CD3^{+}CD4^{+}$ -Zell-Gates aufgetragen wurde (R6, Abb. 5B).

## 2. Material und Methoden



**Abbildung 5: Auswertungsstrategie der durchflusszytometrischen Daten: Die Th17-Zellen definiert als CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>-Zellen.**

A: R5 zeigt die CD3<sup>+</sup>-Zellen der Th-Zellpopulation. B: R6 stellt die CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>-Zellen der CD3<sup>+</sup>-Th-Zellen dar.

### 2.12.2. Auswertung der mittels qPCR erhobenen Daten

Die mittels qPCR erhobenen Daten wurden zunächst mit Hilfe des Programms Bio-rad iQ5 Standard Edition (Biorad Laboratories, München) auf Plausibilität geprüft, indem die Schmelzkurven der drei Ansätze einer Probe betrachtet wurden. Aus den Mittelwerten der Ansätze wurde jeweils der  $\Delta$ cT-Wert zwischen GAPDH und RORc und GAPDH und IL-17 berechnet. Dabei erfolgte eine Subtraktion des GAPDH-cT-Wertes als endogenes Kontrollgen von dem cT-Wert des zu untersuchenden Gens RORc oder IL-17. Die darauffolgende statistische Auswertung erfolgte mit Excel 2011 Version 14.0 (Microsoft, Washington, USA).

### 2.12.3. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mit Hilfe von Excel 2011 Version 14.0 (Microsoft, Washington, USA) sowie GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., La Jolla, USA). Bei der statistischen Auswertung wurde eine Prätest-Wahrscheinlichkeit von  $\alpha = 0,005$  und eine statistische Signifikanz bei p-Werten  $< 0,05$  vorausgesetzt. Die Normalverteilung der erhobenen Werte wurde mittels Kolmogorow-Smirow-Tests überprüft. Bei Normalverteilung (Werte  $> 0,5$ ) wurde zum Vergleich zweier Gruppen der ungepaarte t-Test verwendet. Sobald in einer Gruppe keine Normalverteilung vorlag, wurde der Mann-Whitney-U-Test



## 2. Material und Methoden

genutzt. Um Korrelationen darzustellen, wurden der Pearson-Koeffizient bei Normalverteilung und der Spearman-Koeffizient bei Nicht-Normalverteilung der Gruppen verwendet.

## 3. Ergebnisse

### 3.1. Durchflusszytometrisch erhobene Daten

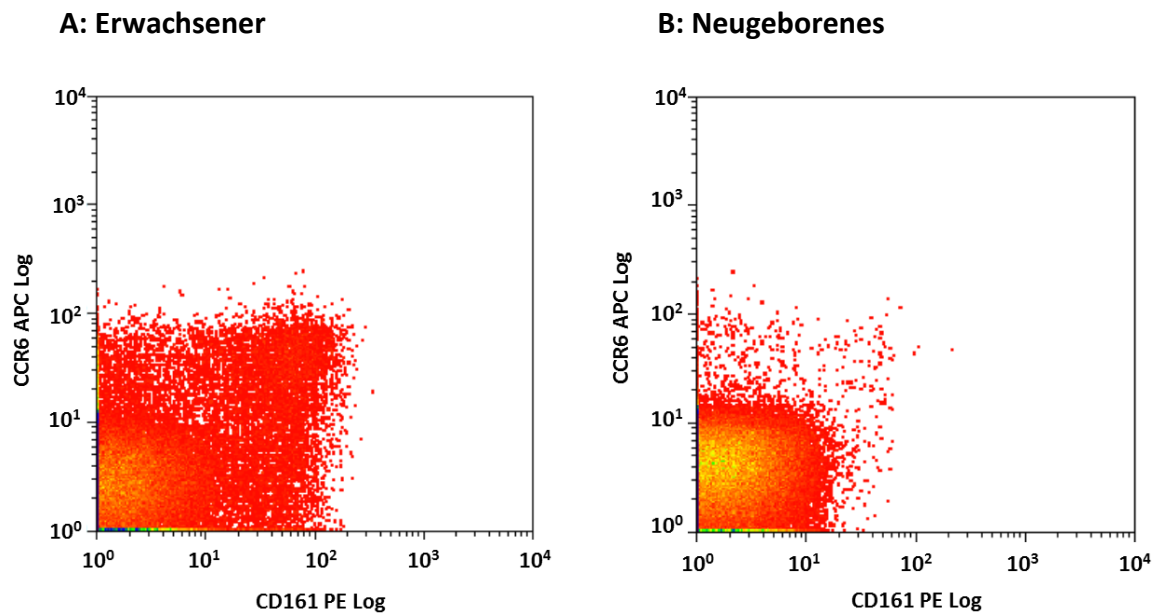
#### 3.1.1. Unterschiedliche Anteile an Th17-Zellen: Vergleich von Nabelschnurblutproben und Proben erwachsener gesunder Probanden

Zunächst wurde in dieser Arbeit untersucht, ob es einen Unterschied zwischen den Blutproben der Neugeborenen und der erwachsenen Probanden gibt. Nach Auswertung der FACS-Daten zeigten sich in den Nabelschnurblutproben jeweils ein mehr als 90 % geringerer Anteil an  $CD3^+CD4^+CD161^+CCR6^-$  und  $CD3^+CD4^+IL-17^+$ -Zellen als in den Blutproben der erwachsenen gesunden Probanden. Wie in der Tabelle 26 gezeigt, betrug der Anteil an  $CD3^+CD4^+CD161^+CCR6^-$  Zellen in der Gruppe der Neugeborenen durchschnittlich 0,40 % im Vergleich zu einem Anteil von durchschnittlich 4,84 % in der Gruppe der erwachsenen gesunden Probanden. Der Anteil der  $CD3^+CD4^+IL-17^+$ -Zellen betrug in der Gruppe der Neugeborenen durchschnittlich 2,5 % und in der Gruppe der Erwachsenen 37,15 %.

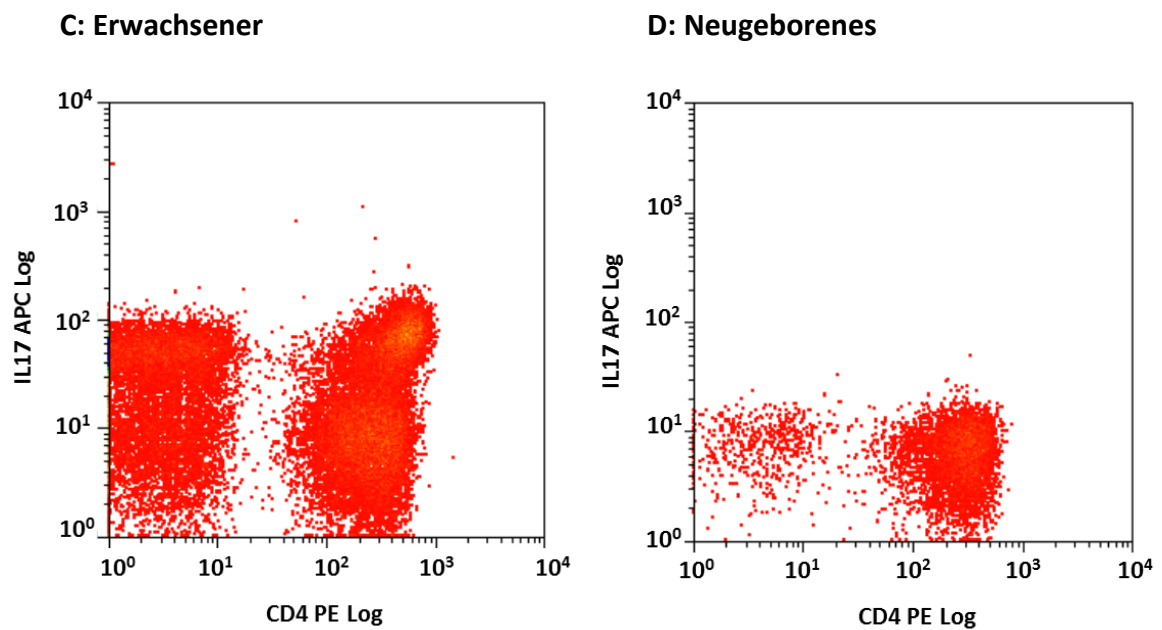
Im Folgenden sind in Abbildung 6 beispielhaft die Auswertungen einer Erwachsenen- und einer Neugeborenen-Probe dargestellt. Die Probe des Neugeborenen enthielt weniger  $CD3^+CD4^+CD161^+CCR6^-$  und  $CD3^+CD4^+IL-17^+$ -Zellen. Im Vergleich zu der adulten peripheren Blutprobe (A) konnte im Nabelschnurblut (B) nur ein geringerer Anteil der  $CD3^+CD4^+CD161^+CCR6^-$ -Zellen nachgewiesen werden. Auch nach der Zellstimulation bestehen die Unterschiede im Anteil der Th17-Zellen im Vergleich von adulten (C) zu neonatalen (D) Th17-Zellen fort.

### 3. Ergebnisse

#### CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>-Zellen



#### CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>- Zellen



**Abbildung 6: Unterschiedliche Anteile an Th17-Zellen: Vergleich von einer Nabelschnurblutprobe und einer Probe eines erwachsenen Probanden.**

A und B: Darstellung der nativ gefärbten Th17-Zellen, definiert als CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>-Zellen. C und D: Darstellung der intrazellulär gefärbten Th17-Zellen nach der Kurzzeit-Zellstimulation, definiert als CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>-Zellen

### 3. Ergebnisse

**Tabelle 26: Vergleich des Mittelwertes  $\pm$  Standardfehler von Proben erwachsener Probanden und Neugeborener**

	Blutprobe von erwachsenen gesunden Probanden	Nabelschnurblutproben
Anteil der CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD161 <sup>+</sup> CCR6 <sup>+</sup> - Zellen an der Th-Zellpopulation (%)	<b>4,84 <math>\pm</math> 0,93</b>	<b>0,40 <math>\pm</math> 0,10</b>
Anteil der CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> IL-17 <sup>+</sup> - Zellen an der Th-Zellpopulation (%)	<b>37,15 <math>\pm</math> 3,65</b>	<b>2,5 <math>\pm</math> 0,4</b>

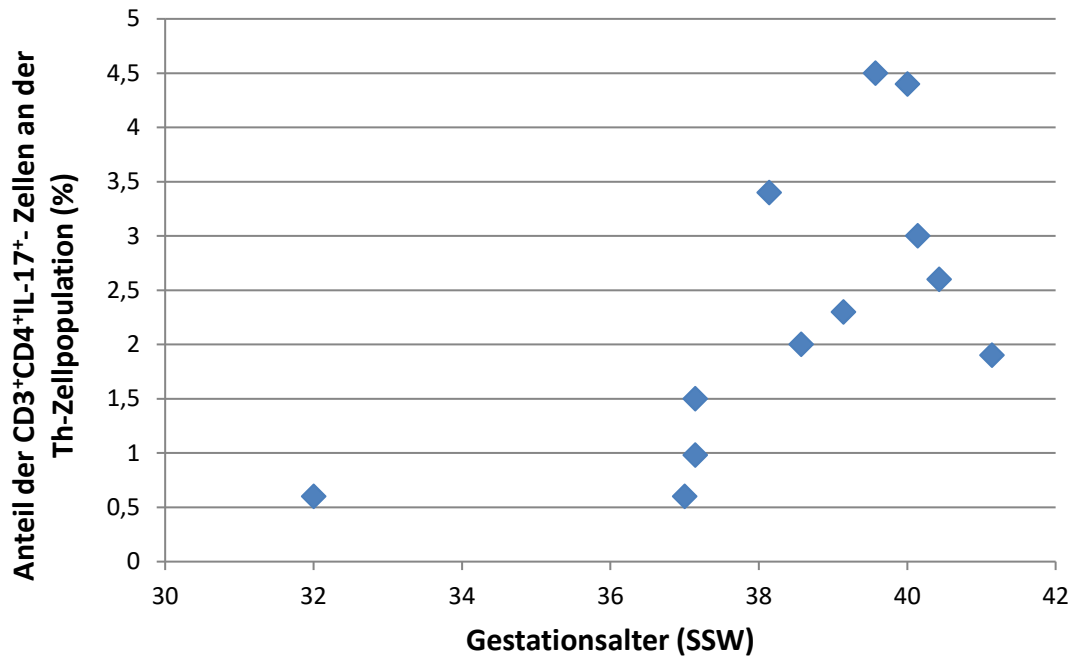
#### **3.1.2 Anteil der Th17-Zellen in Abhängigkeit vom Reifegrad der Neugeborenen**

Da Zellen, welche zuvor als Th17-Zellen definiert wurden, auch bei Neugeborenen gezeigt werden konnten, wurde die Abhängigkeit von der Reife der Neugeborenen sowie die Stimulierbarkeit dieser Zellen zur Produktion von IL-17 untersucht.

##### **3.1.2.1. Korrelation zwischen dem Reifegrad der Neugeborenen und dem Anteil an IL-17- exprimierenden Zellen**

In Abbildung 7 zeigt sich, dass der Anteil der CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>-Zellen an der gesamten Th-Zell-Population signifikant mit dem Gestationsalter von 0,6 % mit 32 SSW auf 3 % mit 40+1 SSW zunimmt ( $p < 0,05$ ).

### 3. Ergebnisse

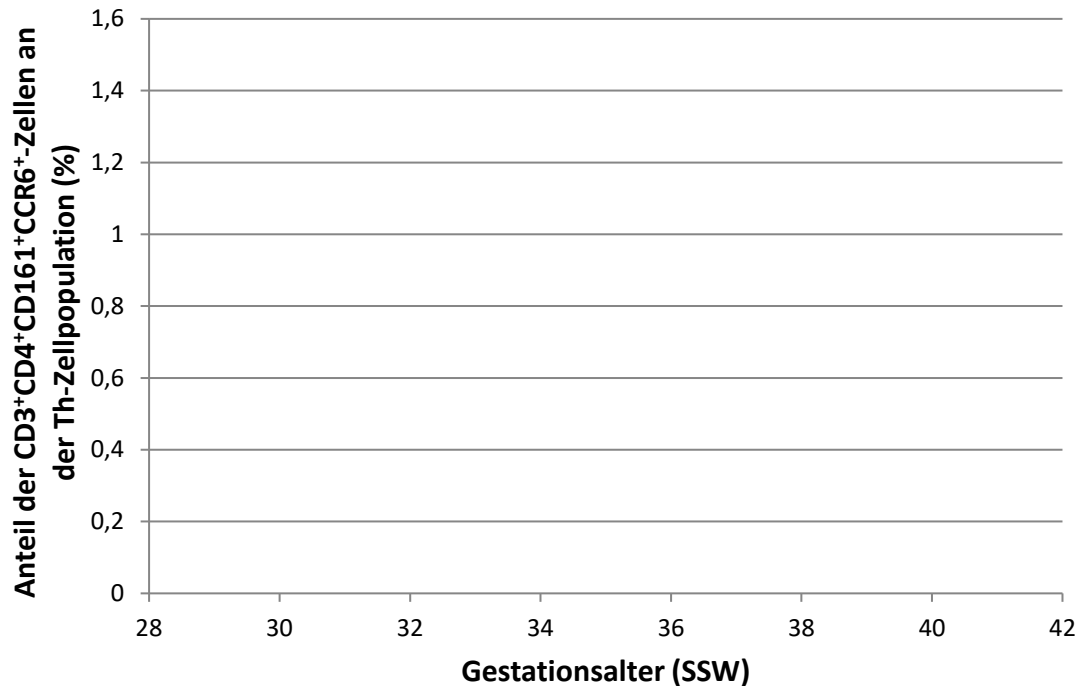


**Abbildung 7: Stimulierbarkeit der Th17-Zellen im Nabelschnurblut in Abhängigkeit von der Reife der Neugeborenen:** Der Anteil der CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>-Zellen an der gesamten Th-Zell-Population nimmt signifikant mit dem Gestationsalter zu ( $p < 0,05$ ).

#### 3.1.2.2. Der Reifegrad der Neugeborenen hat keinen Einfluss auf den Anteil nativer Th17 Zellen (Oberflächenfärbung)

Im Vergleich des Anteils der CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>-Zellen an der Th-Zell-Population mit der Reife konnte kein signifikanter Zusammenhang verzeichnet werden ( $p=0,07$ ) (Abb. 8). Hier zeigten sich beispielsweise Anteile von CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>-Zellen an der Th-Zell-Population von 0,5 % bei einem Frühgeborenen mit 29+0 SSW und 0,2 % bei einem Reifgeborenen mit 41+1 SSW.

### 3. Ergebnisse

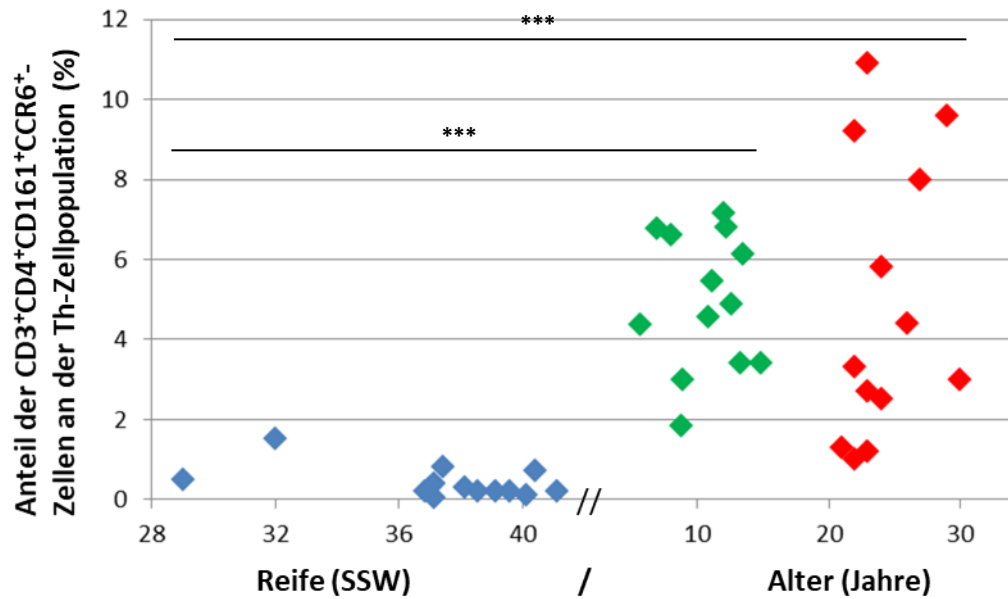


**Abbildung 8: Anteil der nativen Th17-Zellen im Nabelschnurblut in Abhängigkeit von der Reife der Neugeborenen.** Es zeigt sich keine signifikante Korrelation von dem Anteil der CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>-Zellen an der Th-Zellpopulation und der Reife der Neugeborenen ( $p=0,07$ ).

#### 3.1.3. Altersabhängigkeit der Th-17-Zellfrequenz

Betrachtet man die drei Lebensaltersgruppen Neugeborene, Kinder und Erwachsene, so zeigt sich sowohl für die Oberflächenfärbung der nativen Th17-Zellen ( $p<0,01$ ) als auch für die intrazellulär gefärbten Zellen nach Stimulation ( $p<0,01$ ) ein signifikanter Anstieg des Anteils der Th17-Zellen mit dem Lebensalter (Abbildungen 9 und 10).

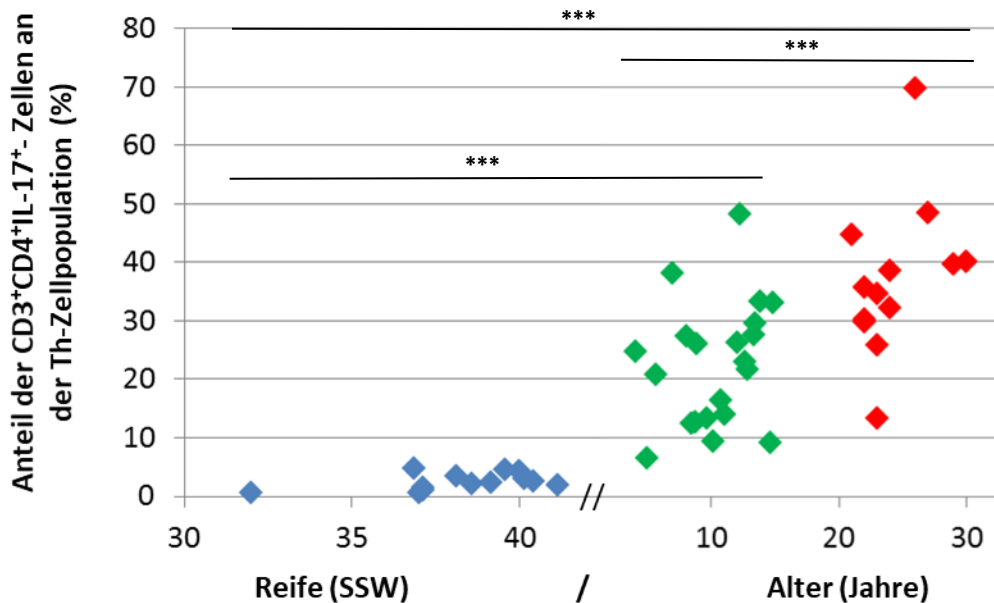
### 3. Ergebnisse



**Abbildung 9: Altersabhängigkeit der Th17-Zellfrequenz: Darstellung der Oberflächenfärbung.**

blau: Anteil der CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>-Zellen an der Th-Zellpopulation der Nabelschnurblutproben, grün: Anteil der CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>-Zellen an der Th-Zellpopulation der peripheren Blutproben von gesunden Kindern im Alter von 4 – 17 Jahren, rot: Anteil der CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>-Zellen an der Th-Zellpopulation der peripheren Blutproben von gesunden Erwachsenen. Es besteht ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Anteil der CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>-Zellen an der Th-Zellpopulation und dem Lebensalter ( $p < 0,01$ ). \*\*\*:  $p < 0,01$

### 3. Ergebnisse



**Abbildung 10: Altersabhängigkeit der Th17-Zellfrequenz: Darstellung der intrazellulären Färbung**

blau: Anteil der CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>-Zellen an der Th-Zellpopulation der Nabelschnurblutproben, grün: Anteil der CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>-Zellen an der Th-Zellpopulation der peripheren Blutproben von gesunden Kindern im Alter von 4 – 17 Jahren, rot: Anteil der CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>-Zellen an der Th-Zellpopulation der peripheren Blutproben von gesunden Erwachsenen. Es besteht ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Anteil der CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>-Zellen an der Th-Zellpopulation und dem Lebensalter ( $p < 0,01$ ). \*\*\*:  $p < 0,01$

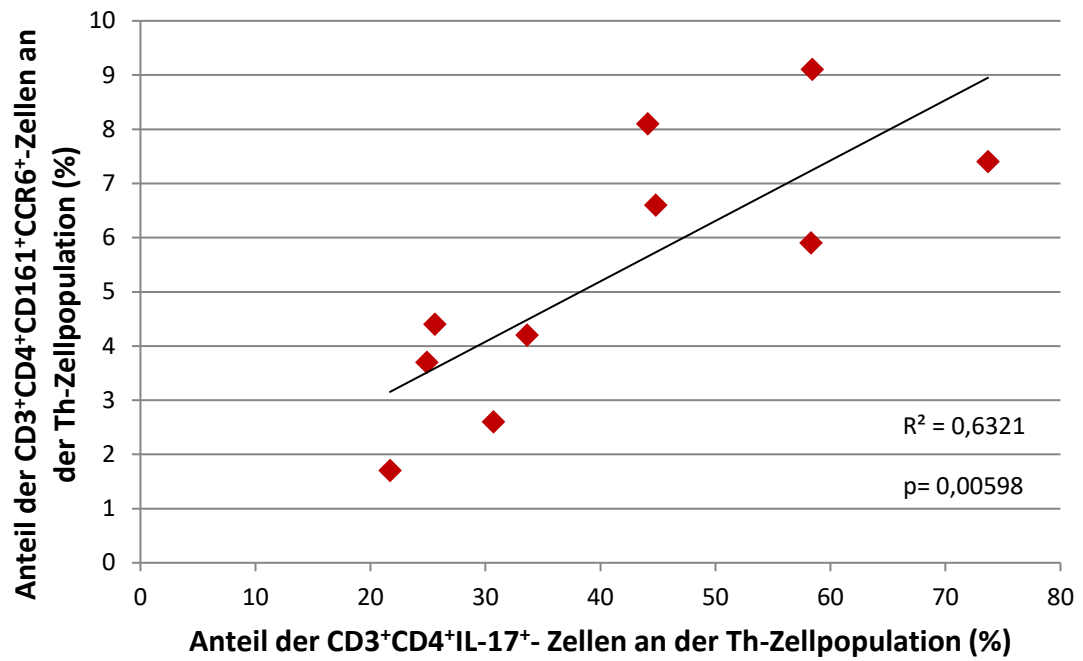
#### 3.1.4. Größerer Anteil an Th17-Zellen mit zunehmender Obstruktion bei COPD-Patienten

Da die Th17-Zellen in der Pathogenese und im Progress der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung involviert zu sein scheinen, wurden die Anteile der CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>-Zellen und der CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>-Zellen an der Th-Zellpopulation dieser Patientengruppe untersucht und dabei zusätzlich ein Augenmerk auf die FeV1, als Maßstab der Lungenfunktion, gelegt.

Es konnte ein signifikanter Zusammenhang der Oberflächenfärbung und der intrazellulären Färbung in der Gruppe der COPD-Patienten gefunden werden ( $p < 0,01$ ) (Abbildung 11). Dabei betrug der Anteil der CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>-Zellen an der Th-Zell-Population insgesamt  $8,6 \% \pm 1,56 \%$  und der Anteil der CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>-Zellen an der Th-Zell-Population  $39,04 \% \pm 5,3 \%$ .



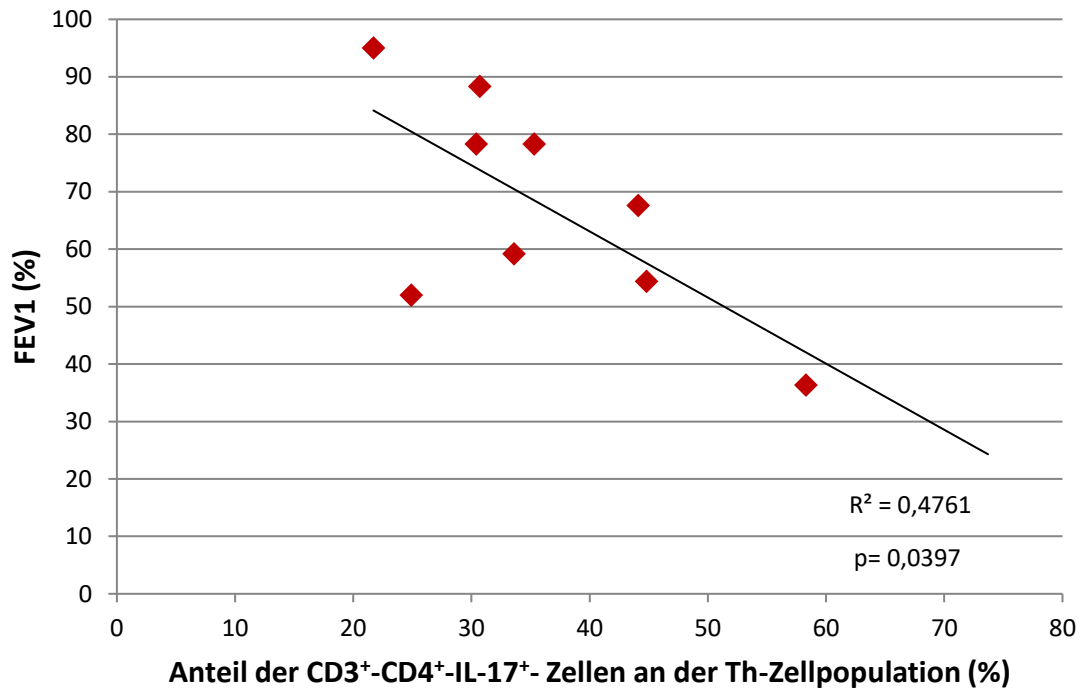
### 3. Ergebnisse



**Abbildung 11: Korrelation der Oberflächenfärbung und der intrazellulären Färbung bei Patienten mit COPD**

### 3. Ergebnisse

Es konnte ein signifikanter Zusammenhang der intrazellulären Färbung in der Gruppe der COPD-Patienten mit der Einsekundenkapazität als Maß der Obstruktion gefunden werden ( $p < 0,05$ ) (Abbildung 12).



**Abbildung 12: Negative Korrelation bei Patienten mit COPD zwischen der Lungenfunktion und dem Anteil der Th17-Zellen**, welche durch die intrazelluläre Färbung registriert wurden.

### 3.2. Die Expression von ROR $\gamma$ t und IL-17 auf Genebene

#### 3.2.1. Gesteigerte Expression von ROR $\gamma$ t und IL-17 bei zunehmendem Th17-Zell-Anteil

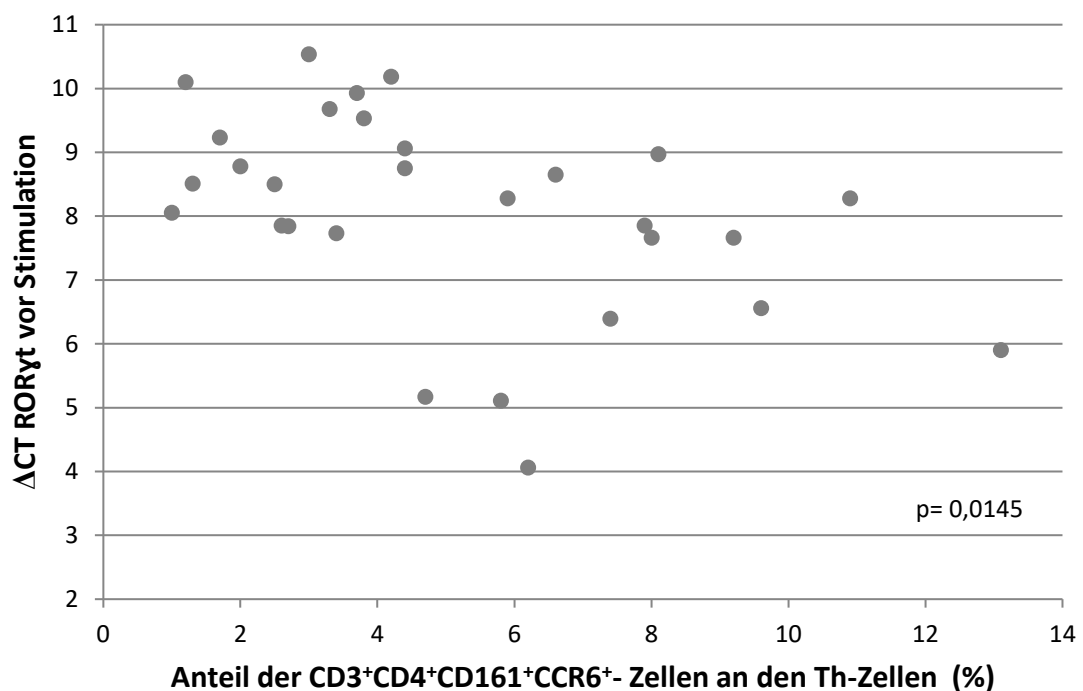
In allen Proben konnte gezeigt werden, dass vor der Kurzzeitstimulation keine Expression von IL-17 stattfand. Nach der Zellkultur konnte zwar die Expression von IL-17 nachgewiesen werden, allerdings ohne signifikante Korrelation mit der intrazellulären Färbung der Th17-Zellen.

Ein signifikanter gruppenübergreifender Zusammenhang konnte jedoch für die Oberflächenfärbung und aller untersuchten Transkriptionsfaktoren bei Erwachsenen

### 3. Ergebnisse

gezeigt werden. Im Folgenden wurden jeweils die relative Expressionsrate des jeweiligen Transkriptionsfaktors auf der Y-Achse gegen den Anteil der  $CD3^+CD4^+CD161^+CCR6^+$ -Zellen an den Th-Zellen auf der X-Achse aufgetragen. Im Gegensatz zu den Proben erwachsener Probanden konnte bei den Neugeborenen nur in 3 Fällen eine geringe Expression von IL-17 nach der Stimulation nachgewiesen werden ( $\Delta CT: 2,34 \pm 1,32$ ).

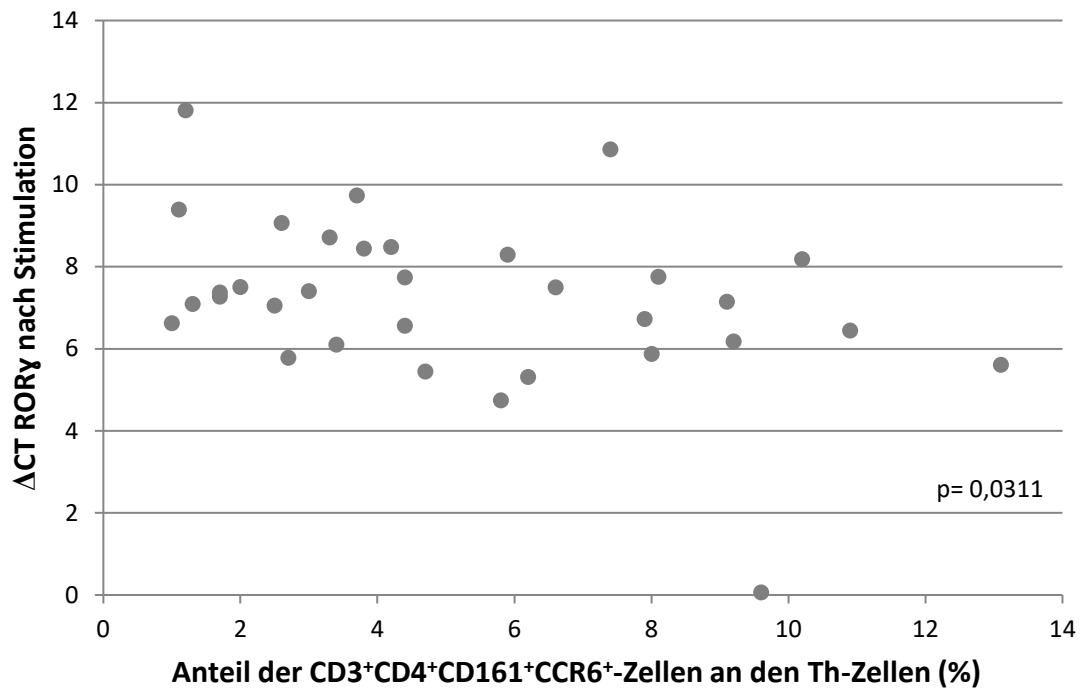
Es zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang der relativen Expressionsrate von ROR $\gamma$ t vor der Stimulation und des Anteils der  $CD3^+CD4^+CD161^+CCR6^+$ -Zellen an der Th-Zell-Population ( $p < 0,05$ ) (Abbildung 13). Somit nahm die relative Expressionsrate von ROR $\gamma$ t mit steigender Th17-Zellzahl bei Erwachsenen zu.



**Abbildung 13: Zusammenhang der relativen Expressionsrate von ROR $\gamma$ t vor Stimulation und der mittels Oberflächenfärbung ermittelten Anteile der Th17-Zellen.**

### 3. Ergebnisse

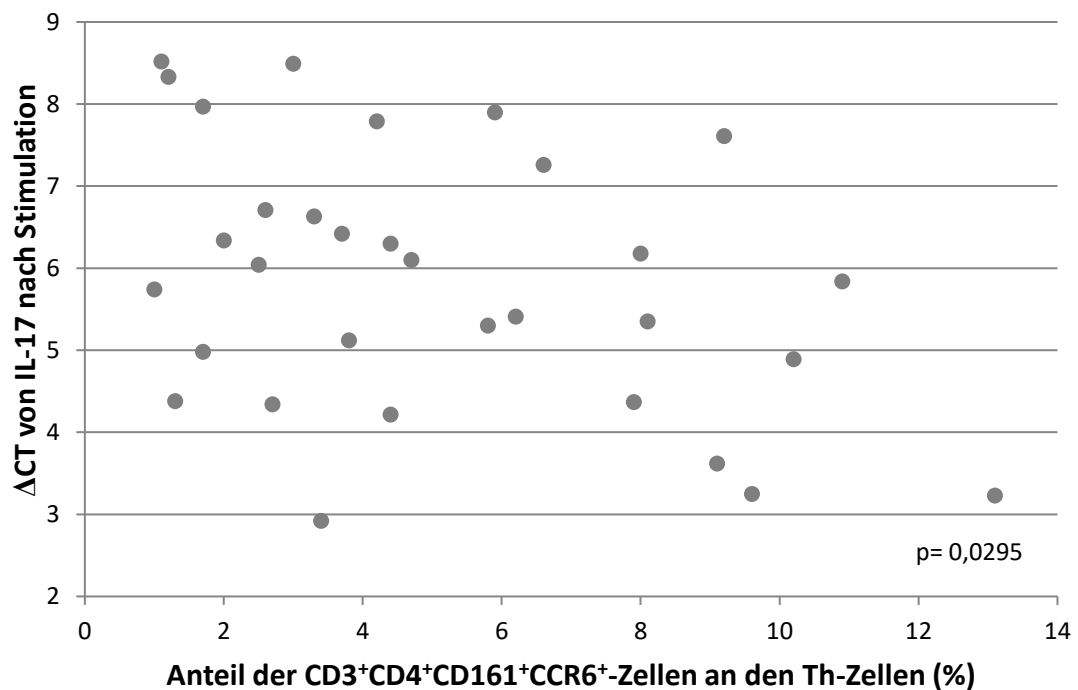
Auch nach der Kurzzeitstimulation nahm die relative Expressionsrate des Transkriptionsfaktors mit dem steigenden Anteil der Th17-Zellen von  $\Delta CT 8,62 \pm 0,33$  auf  $\Delta CT 6,93 \pm 0,39$  zu (Abbildung 14).



**Abbildung 14:** Zusammenhang der relativen Expressionsrate von RORγt nach Stimulation und der mittels Oberflächenfärbung ermittelten Anteile der Th17-Zellen.

### 3. Ergebnisse

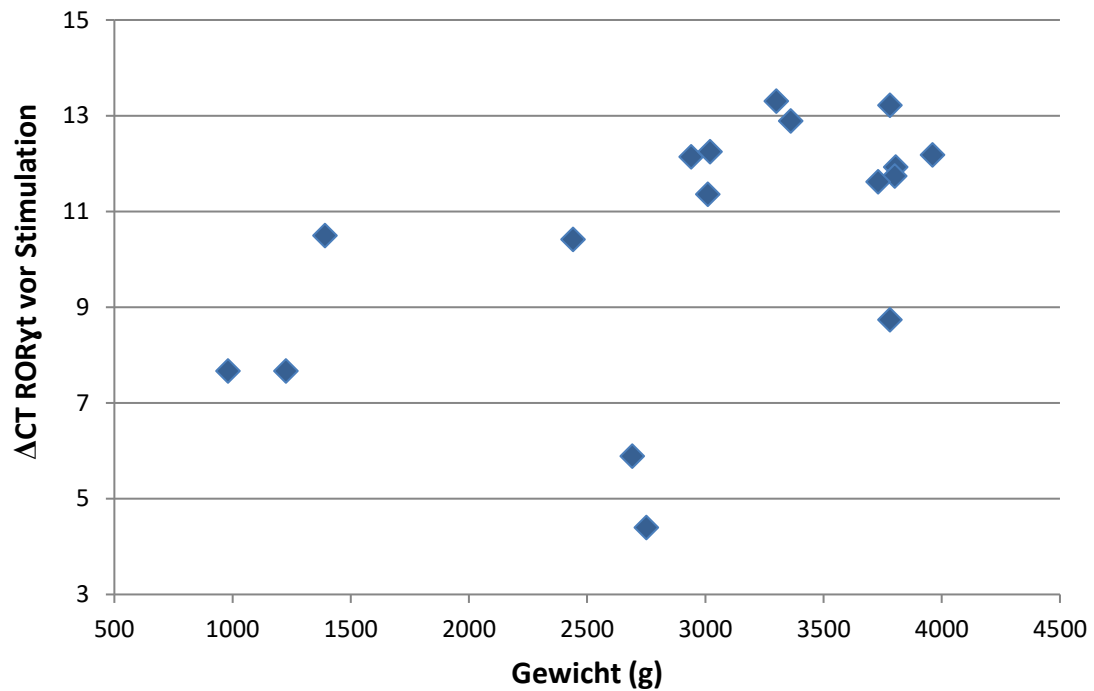
Es konnte ebenfalls eine positive Korrelation zwischen der Expressionsrate von IL-17 und dem mittels Oberflächenfärbung bestimmten Anteil der Th17-Zellen dargestellt werden (Abbildung 15). Auch die relative Expressionsrate von IL-17 nimmt mit der Menge der nativen Th17-Zellen von  $\Delta$  CT von 8,52 bei einem Anteil von 1,1 % Th17-Zellen auf  $\Delta$  CT von 3,23 bei einem Anteil an Th17-Zellen von 13,1 % zu.



**Abbildung 15: Zusammenhang der relativen Expressionsrate von IL-17 und der mittels Oberflächenfärbung ermittelten Anteile der Th17-Zellen.**

### 3. Ergebnisse

In der Gruppe der Neugeborenen konnte hingegen gezeigt werden, dass die Expression von RORyt vor der Kurzzeitstimulation in Abhängigkeit von dem Gewicht und damit indirekt abhängig von der Reife abnimmt ( $p < 0,05$ ). Für die Expression von RORyt nach Stimulation konnte kein signifikanter Zusammenhang nachgewiesen werden.



**Abbildung 16: Die relative Expressionsrate von RORyt in der Gruppe der Neugeborenen.** Die relative Expressionsrate von RORyt vor der Kurzzeitstimulation nimmt mit steigendem Gewicht, als Surrogat für die Reife ab ( $p < 0,05$ ).

### 4. Diskussion

In dieser Arbeit wurden Th17-Zellen durch unterschiedliche Merkmale charakterisiert. Durch eine Oberflächenfärbung wurden mit Hilfe der Oberflächenmerkmale CD3, CD4, CD161 und CCR6 die nativen, zirkulierenden Th17-Zellen bestimmt. Mit einer intrazellulären Färbung wurden das intrazelluläre Leitzytokin IL-17 und die Oberflächenmerkmale CD3 und CD4 und somit die Stimulierbarkeit der Zellen dargestellt. Diese Untersuchung wurde nach einer Kurzzeitstimulation durchgeführt. Durch die Nutzung des *Permabilisation-Buffers* wurde die Permeabilität der Zellmembran erhöht, wodurch eine intrazelluläre Färbung von IL-17 möglich wurde. Zusätzlich wurden die Proben der nativen und der stimulierten PBMCs mittels qPCR auf die Expression von ROR $\gamma$ t und IL-17 untersucht, um ebenfalls Veränderungen nach der Kurzzeitstimulation auf Genebene zu detektieren.

In dieser Arbeit konnten Th17-Zellen bereits bei Neugeborenen nachgewiesen werden und es konnte gezeigt werden, dass deren Anteil an der Th-Zellpopulation mit dem Lebensalter zunimmt. Zudem zeigte sich eine zunehmende Stimulierbarkeit zur Zytokin-Produktion in Abhängigkeit des Reifegrades von Neugeborenen. Außerdem konnte bei COPD-Patienten ein Zusammenhang zwischen dem Anteil der Th17-Zellen an der Th-Zellpopulation und der FeV1, als Maß für den Grad der Atemwegs-Obstruktion, dargestellt werden. Ein weiterer wichtiger Aspekt konnte mit dieser Studie auf Genebene gezeigt werden, da die Expression von ROR $\gamma$ t mit der Unreife der Neugeborenen zunahm.

#### 4.1. Stärken und Schwächen dieser Studie

Die Vergleichbarkeit verschiedener Studien zu Th17-Zellen mit der vorliegenden Arbeit ist durch verschiedene Gründe erschwert. Da es weder eine einheitliche phänotypische Definition der Th17-Zellen noch Studien mit identischen Studienprotokollen gibt, wurde in dieser Arbeit meist auf Angaben absoluter Werte, wie in der Arbeit von Schindler, verzichtet (Schindler, 2018).

#### 4. Diskussion

Eine Schwäche ist der rein deskriptive Ansatz der Studie, weshalb nur quantitative Aussagen zu dem Vorkommen von Th17-Zellen getroffen werden können, jedoch nicht zu speziellen Einflussfaktoren der Th17-Zell-Differenzierung und Proliferation.

Eine weitere Schwäche dieser Arbeit ist, dass die COPD-Patienten nicht nach der gängigen GOLD-Klassifikation klassifiziert wurden, sondern lediglich die FeV1 als Parameter der Atemwegs-Obstruktion zur Verfügung stand. Dadurch konnte lediglich deskriptiv ein Zusammenhang gezeigt werden, während weitere klinische Parameter, wie Exazerbationen, nicht mit einbezogen werden konnten. Außerdem stand für die Gruppe der COPD-Patienten keine altersgematchte Kontrollgruppe gesunder Erwachsener zur Verfügung. Daher wurden die Daten mit einer Gruppe gesunder 22 - 30-jähriger Probanden verglichen.

Es ist unklar, ob Umwelteinflüsse den Anteil von zirkulierenden Th17-Zellen und ihre Stimulierbarkeit beeinflussen. Daher könnten unterschiedliche Herkunftsorte der Neugeborenen (Marburg und Umgebung) und der erwachsenen Probanden (Studierende, die überwiegend aus anderen Gegenden Deutschlands stammen) die Studienergebnisse beeinflusst haben.

Eine Stärke dieser Studie sind die engen Grenzen der Einschlusskriterien, denn es wurden nur gesunde Probanden in die Kontrollgruppe der Erwachsenen und in die Gruppe der Neugeborenen aufgenommen, sodass ein Einfluss auf das Vorkommen von Th17-Zellen durch eine bestehende Infektion oder Autoimmunerkrankung weitestgehend ausgeschlossen werden kann. Ein wichtiger Aspekt ist die Vergleichbarkeit verschiedener Arbeiten in der Arbeitsgruppe. In der Literatur wird die Definition der Th17-Zellen nach wie vor kontrovers diskutiert. In dieser Arbeit wurde deshalb darauf geachtet, die Oberflächenmerkmale und Zytokine, welche meist zur Definition der Th17-Zellen genutzt werden, beizubehalten. Alle Arbeiten zu diesem Th-Subtyp wurden nach dem gleichen Protokoll und mit den identischen Reagenzien durchgeführt, sodass eine gute Vergleichbarkeit gewährleistet ist. Somit konnten in dieser Arbeit Daten von Theresa Schindler herangezogen werden, um das Altersspektrum zu komplettieren. Innerhalb dieser Studie wurden alle Proben durch eine Person verarbeitet, die Daten daraufhin verblindet und dann wiederum von nur einer Person ausgewertet, sodass der Einfluss von Confoundern an diesen Stellen



#### 4. Diskussion

gering war. Eine weitere Stärke dieser Studie ist die Charakterisierung eines Zelltyps mit zwei unterschiedlichen Methoden sowie die Erweiterung der Untersuchungen auf Genebene.

##### **4.2. Geringere Anteile von Th17-Zellen im Nabelschnurblut als in Blutproben erwachsener Probanden**

Es konnten im Nabelschnurblut geringere Anteile an Th17-Zellen, sowohl mit Hilfe der Oberflächen- als auch der intrazellulären Färbung, nachgewiesen werden, als in dem Blut erwachsener Probanden. In der Oberflächenfärbung wurde der Anteil der CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>-Zellen und in der intrazellulären Färbung der Anteil der CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>-Zellen jeweils an der Th-Zell-Population bestimmt. Dieses Ergebnis unterstützt die Hypothese von Tuomela et al., dass sich nicht-naive-Th17-Zellvorläufer im Nabelschnurblut befinden, die Menge aber sehr gering ist (Tuomela, et al. 2012).

Selbst nach Zugabe der Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-23, die bei adulten naiven T-Zellen in der Regel die IL-17-Produktion über die Induktion von ROR $\gamma$ t fördern, konnten in Versuchen von de Roock et al. nur geringe Mengen von IL-17 festgestellt werden (de Roock, et al. 2013).

Diese Sachverhalte weisen auf eine im Vergleich zu Erwachsenen geringere Immunantwort von Neugeborenen hin.

##### **4.3. Die Stimulierbarkeit der Th17-Zellen nimmt mit dem Reifegrad von Neugeborenen zu**

Wir konnten in dieser Arbeit keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Anteil der in Oberflächenfärbung gefärbten Th17-Zellen und dem Reifegrad der Neugeborenen nachweisen, was nahe legt, dass dieser Zelltyp in allen Reifestadien in geringem Maße vorhanden ist, die Reife aber anscheinend keine Rolle spielt.

Dem gegenüber stehen die Ergebnisse der intrazellulär gefärbten Th17-Zellen. Hier korreliert die Frequenz der IL-17-positiven Zellen mit der Reife der Neugeborenen,

#### 4. Diskussion

sodass damit eine Stimulierbarkeit dieses Th-Zell-Subtyps im Nabelschnurblut in Abhängigkeit vom Gestationsalter gezeigt werden konnte. Wir schließen aus den beiden genannten Beobachtungen, dass nur ein gewisser Anteil von Th17-Zellen im Nabelschnurblut von Neugeborenen vorhanden ist, die Funktion, nach Stimulation IL-17 zu bilden, aber mit zunehmendem Reifegrad der Neugeborenen zunimmt. Im Gegensatz dazu konnten Cosmi et al. unter ähnlichen Bedingungen, eine Stimulation mit PMA und Ionomycin, im Nabelschnurblut keine IL-17-Produktion nachweisen, sondern erst nach Zugabe von IL-1 $\beta$  und IL-23 (Cosmi, et al. 2008). Auch Dijkstra et al. führten eine Stimulation über 4 Stunden von PBMCs aus Nabelschnurblut mit PMA und Ionomycin durch. Diese Arbeitsgruppe konnte nur geringe Konzentrationen von IL-17 registrieren, jedoch keine Altersabhängigkeit der IL-17-Konzentrationen (Dijkstra, et al. 2014).

In der Analyse auf Genebene konnte in einer qPCR die Expression von ROR $\gamma$ t in nativen Zellen gezeigt werden und dass IL-17 vor der Kurzzeitstimulation nicht exprimiert wurde. Unsere Ergebnisse untermauern somit frühere Studien, dass sich im Nabelschnurblut bereits CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup>-T-Zellen befinden, die zwar ROR $\gamma$ t, IL-23R und CCR6 exprimieren, jedoch kein IL-17 ohne vorherige Stimulation (Schmitt and Ueno 2015).

Zusammenfassend weisen bisherige Untersuchungen darauf hin, dass neonatale CD4<sup>+</sup>-Zellen noch nicht im selben Maße differenziert sind wie adulte Zellen, sodass bei Zellen von Frühgeborenen unter idealen Kulturbedingungen eine Differenzierung in Th17-Zellen in größerem Umfang stattfindet. Bei reiferen Neugeborenen scheint bereits eine Differenzierung zu Th17-Zellen bei einigen CD4<sup>+</sup>-Zellen eingetreten zu sein, wofür die zunehmende Stimulierbarkeit der IL-17-Produktion durch Ionomycin mit zunehmender Reife spricht.

Th17-Zellen spielen eine besondere Rolle bei der Abwehr von Pathogenen wie *Klebsiella pneumoniae* (Korn, et al. 2009) und *Candida albicans* (Acosta-Rodriguez et al., 2007b). Die geringere Stimulierbarkeit der Th17-Zellen bei niedrigerem Gestationsalter kann auf eine geringere Immunkompetenz Frühgeborener hinweisen, was sich durch schwerwiegendere opportunistische Infektionen durch *Klebsiella pneumoniae* und *Candida albicans* äußert.

### 4.4. Altersabhängigkeit der Th-17-Zellfrequenz

Im Vergleich zu vorherigen Untersuchungen in der eigenen Arbeitsgruppe wurden mit dieser Arbeit das untersuchte Altersspektrum ausgeweitet (Schindler, 2018). In der Zusammenschau aller Altersgruppen zeigt sich eine signifikante Korrelation sowohl bei den nativen Th17-Zellen als auch bei der Stimulierbarkeit der Th17-Zellen. Es wurde bereits eine Altersabhängigkeit der Th17-Zellen von Neugeborenen und Kindern von verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben (Stoppelenburg et al., 2014; Cosmi et al., 2008). Allerdings konnten beispielsweise Stoppelenburg et al. bei der Durchführung einer Stimulation über 4 Stunden mit Ionomycin und PMA keine Th17-Zellen bei Neugeborenen registrieren. Dies scheint erst mit Beginn des 2. Lebensmonats bzw. durch eine RSV-Infektion möglich gewesen zu sein (Stoppelenburg et al., 2014).

Es besteht die Möglichkeit, dass eine Vergleichbarkeit von neonatalen, kindlichen und adulten nativen humanen Th17-Zellen und deren Stimulierbarkeit nicht gegeben ist. Bei Erwachsenen können vermehrt Gedächtnis-T-Zellen mit den Oberflächenmarkern CD45<sup>+</sup>RO<sup>+</sup> registriert werden (de Roock et al., 2013). Bei Neugeborenen kann jedoch, durch den natürlichen geringeren Antigen-Kontakt, von einer geringen Anzahl an Gedächtnis-Zellen ausgegangen werden. Ältere Studien konnten bereits zeigen, dass bei Kindern erst im Alter von etwa 15 Jahren ähnliche Mengen an Gedächtnis-T-Zellen vorhanden sind wie bei Erwachsenen (Holt and Jones, 2000). Aus diesem Grund sollte man diese Studie mit den Oberflächenmerkmalen dieser Zellen wiederholen, um eine Vergleichbarkeit der zirkulierenden nativen Th17-Zellen zu erreichen und die Verzerrung durch Gedächtniszellen ausschließen zu können. In der vorliegenden Studie kann somit nur eine Aussage über den allgemein vorhandenen Anteil an IL-17-produzierenden Th-Zellen und deren Stimulierbarkeit getroffen werden, nicht jedoch darüber, inwieweit die Stimulierbarkeit gegebenenfalls von der Menge der Gedächtniszellen abhängt.

### **4.5. Die Einsekundenkapazität nimmt mit steigendem Anteil von Th17-Zellen bei COPD-Patienten ab**

In dieser Studie konnte mit einer neuen Methode, der intrazellulären Färbung von IL-17 nach vorangegangener Kurzzeit-Zellstimulation, eine negative Korrelation von der FEV1 mit dem Anteil der Th17-Zellen an der Th-Zellpopulation nachgewiesen werden.

Im Tiermodell konnte bei der Untersuchung von IL-17-Konzentrationen in Geweben gezeigt werden, dass die Menge an IL-17 aus der BAL und im Lungengewebe mit dem Grad der Muskelzellproliferation korreliert (Shen, et al. 2004). Dieser Sachverhalt konnte in der vorliegenden Studie indirekt dargestellt werden. Probanden mit COPD wiesen mit zunehmendem Anteil an Th17-Zellen eine verminderte FEV1 auf. Die FEV1 kann als Maß für die durch Muskelzellproliferation und den Entzündungsprozess entstehende Obstruktion gewertet werden (Vogelmeier et al., 2007). Dies unterstützt die Daten einer Studie von Vargas-Rojas et al., die ebenfalls zeigen konnten, dass der Anteil der Th17-Zellen mit der FEV1 negativ korreliert (Vargas-Rojas, et al. 2011). Weitere Studien konnten ähnliche Ergebnisse bei der Untersuchung von Sputum-Proben zeigen. Auch hier korrelierte die Konzentration an IL-17 mit der Atemwegsobstruktion (Chen, et al. 2011).

Im Vergleich zwischen den an COPD erkrankten Probanden und der gesunden Kontrollgruppe ähnliche Anteile an Th17-Zellen könnten sich auf eine gute medikamentöse Basistherapie mit inhalativen Glukokortikoiden der untersuchten Patienten zurückführen lassen. In dieser Untersuchung wiesen COPD-Patienten weder einen vermehrten Anteil an nativen noch eine verbesserte Stimulierbarkeit von Th17-Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe von gesunden Probanden auf. Vargas-Rojas et al. konnten hingegen signifikant erhöhte Spiegel an Th17-Zellen bei COPD-Patienten im Vergleich zu den gesunden Probanden registrieren (Vargas-Rojas, et al. 2011). Es konnte in früheren Studien gezeigt werden, dass bei akut exazerbierter COPD das Verhältnis von Th17-Zellen zu Treg-Zellen zur inflammatorischen Immunantwort verschoben ist, wohingegen bei einer stabilen COPD die Menge der Treg-Zellen dominiert (Li, Pan, and Qiu 2014). Dies könnte ein Erklärungsansatz für den in dieser Studie fehlenden Unterschied zwischen der

## 4. Diskussion

COPD-Gruppe und der gesunden Kontroll-Gruppe sein, da vor allem Patienten mit niedrig gradiger COPD nach der FEV1 (% Soll) und ohne akute Exazerbation untersucht wurden. Da das Augenmerk nur auf den Anteil der Th17-Zellen gelegt wurde, kann bei dieser Untersuchung keine Aussage zu dem Verhältnis von Th17-Zellen zu Treg in den unterschiedlichen Gruppen getroffen werden.

### 4.6. Verstärkte Expression von IL-17 nach Kurzzeitstimulation

In den cDNA-Proben, welche vor der Kurzzeitstimulation entnommen wurden, lag die IL-17-Expression sowohl bei den Proben von Neugeborenen als auch von Erwachsenen unter der Nachweisgrenze. Diese Ergebnisse stimmen mit denen der Studie von Cosmi et al. 2008 überein, in der ebenfalls keine Expression von IL-17 in Nabelschnurblutzellen ohne vorherige Stimulation registriert werden konnte (Cosmi, et al. 2008).

Nach der Kurzzeitstimulation hingegen stieg die Expression von IL-17 an. Da die Expressionsraten für ROR $\gamma$ t geringer ausfielen, kann aus diesen Ergebnissen geschlossen werden, dass die durchgeführte Kurzzeitstimulation mit Ionomycin vor allem die IL-17-Produktion induzierte.

Es zeigte sich außerdem, dass die Expression von ROR $\gamma$ t und IL-17 mit Expression der Oberflächenmerkmale CD3, CD4, CD161 und CCR6 korrelierte, was die Plausibilität unserer Oberflächenfärbung untermauert. Dieser Zusammenhang bestätigt, dass die Entwicklung der Th17-Zellen von ROR $\gamma$ t mit beeinflusst wird.

Wir konnten in dieser Arbeit zeigen, dass mit zunehmendem Gewicht der Neugeborenen, als Surrogat für die Reife, die Expression von ROR $\gamma$ t abnimmt. Black et al. konnten in ihren Untersuchungen ebenfalls diesen Sachverhalt beschreiben. Nach der Stimulation konnte in unserer Studie jedoch keine weitere Korrelation festgestellt werden, da wir im Vergleich zu Black et al. lediglich mit Ionomycin stimulierten. Diese Ergebnisse untermauern die Hypothese von Black et al.. Sie schlossen aus ihren Daten, dass Zellen von Neugeborenen mit zunehmender Unreife eher für die Auslösung einer Th17-Zell-Antwort prädisponiert sind, wohingegen bei

#### 4. Diskussion

Zellen von erwachsenen Probanden eine Prädisposition zur Th1-Antwort besteht (Black, et al. 2012).

Untersuchungen von Black et al. auf Genebene belegen, dass in Nabelschnurblutproben von Frühgeborenen und Reifgeborenen eine stärkere Polarisation nach Stimulation mit IL-23, IL-6, IL-1 und TGF $\beta$  zu Th17-Zellen stattfindet, als in adulten Zellen. Es konnte eine stärkere Expression von IL-23R, STAT3, ROR $\gamma$ t, IL6ST(gp130) und TGF $\beta$ R1 in nativen Zellen als beim Erwachsenen registriert werden (Black, et al. 2012).

#### **4.7. Zusammenfassung der diskutierten Aspekte dieser Arbeit**

Zunächst sollte die Frage geklärt werden, ob bereits Th17-Zellen bei Neugeborenen nachgewiesen werden können und ob diese bereits zur IL-17-Produktion stimuliert werden können. In dieser Arbeit konnten mit beiden verwendeten Färbungen Th17-Zellen nachgewiesen werden, jedoch geringere Anteile an Th17-Zellen als bei erwachsenen Probanden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Stimulierbarkeit der Th17-Zellen bereits bei Neugeborenen besteht und mit der Reife zunimmt. Außerdem sollte das Altersspektrum erweitert werden und untersucht werden, ob der Anteil der Th17-Zellen mit dem Lebensalter zunimmt. Auch diese These konnten wir mit den durchgeführten Untersuchungen belegen und eine Altersabhängigkeit des Anteils der Th17-Zellen nachweisen.

Ein weiterer wichtiger Aspekt war die Ausweitung des Untersuchungsspektrums auf Patienten mit COPD als weitere obstruktive Atemwegserkrankung. Hier konnten wir keinen Unterschied zwischen den Anteilen der Th17-Zellen von gesunden Probanden und COPD-Patienten registrieren. Jedoch konnten wir zeigen, dass mit steigendem Anteil der Th17-Zellen die FeV1, als Maß der Obstruktion, abnimmt. Auch auf Genebene sollten verschiedenen Fragen beantwortet werden. Zunächst konnten wir zeigen, dass die durchgeführte Kurzzeitstimulation mit Ionomycin vor allem zu einer gesteigerten Expression von IL-17 führt und nicht von ROR $\gamma$ t. Außerdem konnten wir die Plausibilität unserer Oberflächenfärbung untermauern, indem unsere Untersuchungen eine positive Korrelation der Expression von IL-17 und ROR $\gamma$ t mit

## 4. Diskussion

dem Anteil an Th17-Zellen in der Oberflächenfärbung ergaben. Eine weitere wichtige Beobachtung war, dass die Expression von ROR $\gamma$ t mit der Reife der Neugeborenen abnahm.

### 4.8. Schlussfolgerung und Ausblick

In dieser Dissertation konnte mittels Durchflusszytometrie gezeigt werden, dass bei Neugeborenen bereits Th17-Zellen mit den Oberflächenmerkmalen CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup> vorhanden sind und die Stimulierbarkeit zur IL-17-Produktion von isolierten PBMCs aber abhängig von der Reife der Neugeborenen ist. Dies spricht für eine mit der Reife zunehmende Immunkompetenz der Neugeborenen, welche einen Einfluss auf opportunistische Infektionen vor allem von Frühgeborenen mit *Candida albicans* und *Klebsiella pneumoniae* haben kann. Weitere Untersuchungen könnten darauf abzielen, die Th17-Differenzierung gezielt zu modulieren, um die Immunkompetenz von Früh-/ Neugeborenen zu verbessern. Beispielsweise werden bereits IL-17-Antikörper vor allem in der Dermatologie angewendet.

Der Einfluss von ROR $\gamma$ t auf die Th17-Zell-Differenzierung könnte zum Beispiel die Chance einer gezielten Therapie bei durch Th17-Zellen ausgelösten Erkrankungen bieten. Für die Funktion während der Th17-Zell-Induktion sind zwei Aminosäuren essentiell, diese haben jedoch keinen Einfluss auf die weiteren Funktionen von ROR $\gamma$ t, wie die Entwicklung der Thymozyten und des lymphatischen Gewebes. Diese Aminosäuren würden sich somit als Angriffspunkt für eine „*targeted-therapy*“ eignen. (Korn, 2017)

Auch bei der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung könnte eine weitere Erforschung des Zusammenhangs von Th17-Zellfrequenz und Pathogenese der COPD neue Therapieansätze liefern, da in dieser Arbeit ein Zusammenhang zwischen geringer Einsekundenkapazität und erhöhtem Anteil an Th17-Zellen festgestellt werden konnte.

### 5. Zusammenfassung

Th17-Zellen sind  $CD3^+CD4^+CD161^+CCR6^+$ -Lymphozyten, die nach Stimulation IL-17A, IL-17F und IL-22 produzieren. Dieser T-Zell-Subtyp bildet neben Th1- und Th2-Zellen eine wichtige Säule der T-Zell-vermittelten Pathogen-Elimination und spielt vermutlich auch bei der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen und Allergien eine wichtige Rolle.

Es wird vermutet, dass Th17-Zellen bei Neugeborenen an der Abwehr von Infektionen durch Bakterien und Pilze an epithelialen Oberflächen beteiligt sein könnten. Th17-Zellen könnten auch an der Pathogenese von chronischen Atemwegserkrankungen beteiligt sein. Vor allem bei der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (*Chronic obstructive lung disease, COPD*) scheint es durch ein Missverhältnis von proinflammatorischen Th17-Zellen und protektiven Treg-Zellen zu einer anhaltenden Entzündung und zur Bronchus-Obstruktion durch *Remodeling* zu kommen.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob bei Neugeborenen bereits Th17-Zellen nachweisbar sind und ob deren Anteil bis zum Erwachsenenalter zunimmt. Zusätzlich sollte die Stimulation von Th17-Zellen zur IL-17-Produktion beobachtet werden. Außerdem sollte die Frage geklärt werden, ob COPD-Patienten einen größeren Anteil an Th17-Zellen ausweisen als gesunde Erwachsene und ob es einen Zusammenhang zum Maß der Atemwegsobstruktion gibt.

Zur Klärung der genannten Fragestellungen wurden native Th17-Zellen mit den Oberflächenmerkmalen  $CD3^+CD4^+CD161^+CCR6^+$  durchflusszytometrisch bestimmt. Eine weitere durchflusszytometrische Bestimmung wurde an Zellen nach Kurzzeitstimulation mit Ionomycin und den Merkmalen  $CD3^+CD4^+IL-17^+$  durchgeführt. Zusätzlich wurde an Zellen vor und nach Kurzzeitstimulation eine qPCR zur Untersuchung der Expression von ROR $\gamma$ t und IL-17 durchgeführt.

Mit dieser Arbeit konnte mittels Durchflusszytometrie gezeigt werden, dass im Nabelschnurblut von 17 Neugeborenen bereits native Th17-Zellen vorhanden waren und durch eine Kurzzeitstimulation mit Ionomycin zur IL-17-Sekretion angeregt werden konnten. Der Anteil der stimulierbaren Th17-Zellen von Neugeborenen



## 5. Zusammenfassung

nahm mit dem Gestationsalter zu ( $p < 0,05$ ). Außerdem nahm die Anzahl der zirkulierenden Th17-Zellen im peripheren Blut mit dem Lebensalter vom Neugeborenenalter über das Kindesalter (21 gesunde Probanden) bis zum Erwachsenenalter (13 gesunde Probanden) zu ( $p < 0,01$ ). Auf Genebene konnte, wie schon in früheren Studien, gezeigt werden, dass die Expression von ROR $\gamma$ t mit zunehmender Reife von Neugeborenen abnahm, was vermuten lässt, dass bei zunehmender Unreife eine Prädisposition zur Th17-Zell-Antwort vorliegt. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass die im Vergleich zu Reifgeborenen geringeren Anteile und die geringere Stimulierbarkeit der Th17-Zellen von Frühgeborenen zu deren erhöhter Infektionsanfälligkeit beiträgt.

In dieser Arbeit unterschieden sich die Anteile an Th17-Zellen nicht signifikant zwischen 13 gesunden erwachsenen Probanden und 13 Patienten mit nachgewiesener COPD. Hingegen korrelierte der Th17-Zell-Anteil an den Th-Zellen negativ mit der Einsekundenkapazität ( $p < 0,05$ ) und somit mit dem Maß der Atemwegsobstruktion. Daher könnten sich Th17-Zellen als zusätzlicher Biomarker für die Verlaufskontrolle bei COPD eignen.

## 6. Abstract

Th17-cells are CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>-lymphocytes which are able to produce IL-17A, IL-17F and IL-22 after stimulation. In addition to Th1- and Th2-cells, this T-cell subtype is an important pillar of T-cell-mediated pathogen elimination and is believed to play an important role in the pathogenesis of autoimmune diseases and allergies. This T-cell subtype appears to be involved in the defense against bacterial and fungal infections on epithelial surfaces, especially in premature infants and full-term newborns. Th17-cells are also involved in the pathogenesis of chronic respiratory disease. Especially Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) seems to be associated with persistent inflammation and bronchial obstruction caused by remodeling due to a mismatch of pro-inflammatory Th17-cells and protective Treg-cells.

The aim of this study was to investigate whether Th17-cells are already detectable in neonates and whether their proportion increases until adulthood. In addition, stimulation for IL-17 production should be observed. In addition, the question should be clarified whether COPD patients have a higher proportion of Th17-cells and whether there is a connection to the measure of airway obstruction.

To clarify the above question, native Th17-cells with the surface characteristics CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup> were determined by flow cytometry. A further flow cytometric determination was performed on cells after short-term stimulation with ionomycin and the characteristics CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>. In addition, qPCR was used on cells before and after short-term stimulation to study the expression of ROR $\gamma$ t and IL-17.

Using flow cytometry, this work demonstrated that Th17-cells were already present in the umbilical cord blood of 17 neonates and could be stimulated to induce IL-17 secretion by short-term stimulation with ionomycin. This stimulability of newborn Th17-cells increased with gestational age ( $p < 0,05$ ).

In addition, the number of circulating Th17 cells in the peripheral blood increased from neonatal age to infancy (21 healthy subjects) to adulthood (13 healthy subjects) ( $p < 0,01$ ).

At the gene level, as in previous studies, it could be shown that ROR $\gamma$ t expression declined with increasing maturity of newborns, suggesting that predilection for the Th17 cell response is associated with increasing immaturity.

It can't be excluded, that the increased susceptibility to infections of premature infants is a result of the low Th17-cell stimulability.

It is thought that Th17-cells play a role in the pathogenesis of COPD. In this study, the proportion of Th17-cell did not differ significantly between 13 healthy volunteers and 13 patients with COPD.

In contrast, the Th17-cell fraction of Th cells correlated negatively with the one second capacity ( $p < 0,05$ ). Therefore, Th17-cells may be useful as biomarkers for COPD.

## 7. Literaturverzeichnis

- Acosta-Rodriguez, E. V., G. Napolitani, A. Lanzavecchia, and F. Sallusto, Interleukins 1 $\beta$  and 6 but not transforming growth factor- $\beta$  are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells: *Nat Immunol* (2007a), v. 8, p. 942-9.
- Acosta-Rodriguez, E. V., L. Rivino, J. Geginat, D. Jarrossay, M. Gattorno, A. Lanzavecchia, F. Sallusto, and G. Napolitani, Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells: *Nat Immunol* (2007b), v. 8, p. 639-46.
- Albano, G. D., C. Di Sano, A. Bonanno, L. Riccobono, R. Gagliardo, P. Chanez, M. Gjomarkaj, A. M. Montalbano, G. Anzalone, S. La Grutta, F. L. Ricciardolo, and M. Profita, Th17 immunity in children with allergic asthma and rhinitis: a pharmacological approach: *PLoS One* (2013), v. 8, p. e58892.
- Atkinson, J. J., B. A. Lutey, Y. Suzuki, H. M. Toennies, D. G. Kelley, D. K. Kobayashi, W. G. Ijem, G. Deslee, C. H. Moore, M. E. Jacobs, S. H. Conradi, D. S. Gierada, R. A. Pierce, T. Betsuyaku, and R. M. Senior, The role of matrix metalloproteinase-9 in cigarette smoke-induced emphysema: *Am J Respir Crit Care Med* (2011), v. 183, p. 876-84.
- Bettelli, E., Y. Carrier, W. Gao, T. Korn, T. B. Strom, M. Oukka, H. L. Weiner, and V. K. Kuchroo, Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells: *Nature* (2006), v. 441, p. 235-8.
- Bettelli, E., T. Korn, and V. K. Kuchroo, Th17: the third member of the effector T cell trilogy: *Curr Opin Immunol* (2007), v. 19, p. 652-7.
- Black, A., S. Bhaumik, R. L. Kirkman, C. T. Weaver, and D. A. Randolph, Developmental regulation of Th17-cell capacity in human neonates: *Eur J Immunol* (2012), v. 42, p. 311-9.
- Brüstle, A., S. Heink, M. Huber, C. Rosenplänter, C. Stadelmann, P. Yu, E. Arpaia, T. W. Mak, T. Kamradt, and M. Lohoff, The development of inflammatory T(H)-17 cells requires interferon-regulatory factor 4: *Nat Immunol* (2007), v. 8, p. 958-66.
- Caramori, G., I. M. Adcock, A. Di Stefano, and K. F. Chung, Cytokine inhibition in the treatment of COPD: *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* (2014), v. 9, p. 397-412.
- Chen, K., D. A. Pociask, J. P. McAleer, Y. R. Chan, J. F. Alcorn, J. L. Kreindler, M. R. Keyser, S. D. Shapiro, A. M. Houghton, J. K. Kolls, and M. Zheng, IL-17RA is required for CCL2 expression, macrophage recruitment, and emphysema in response to cigarette smoke: *PLoS One* (2011), v. 6, p. e20333.
- Chen, Y., P. Thai, Y. H. Zhao, Y. S. Ho, M. M. DeSouza, and R. Wu, Stimulation of airway mucin gene expression by interleukin (IL)-17 through IL-6 paracrine/autocrine loop: *J Biol Chem* (2003), v. 278, p. 17036-43.
- Cosmi, L., R. De Palma, V. Santarlasci, L. Maggi, M. Capone, F. Frosali, G. Rodolico, V. Querci, G. Abbate, R. Angeli, L. Berrino, M. Fambrini, M. Caproni, F. Tonelli, E. Lazzeri, P. Parronchi, F. Liotta, E. Maggi, S. Romagnani, and F. Annunziato, Human interleukin 17-producing cells originate from a CD161+CD4+ T cell precursor: *J Exp Med* (2008), v. 205, p. 1903-16.

## 7. Literatuurverzechnis

- de Roock, S., A. J. Stoppelenburg, R. Scholman, S. B. Hoeks, J. Meerding, B. J. Prakken, and M. Boes, Defective TH17 development in human neonatal T cells involves reduced RORC2 mRNA content: *J Allergy Clin Immunol* (2013), v. 132, p. 754-756.e3.
- de Wit, J., Y. Souwer, A. J. van Beelen, R. de Groot, F. J. Muller, H. Klaasse Bos, T. Jorritsma, M. L. Kapsenberg, E. C. de Jong, and S. M. van Ham, CD5 costimulation induces stable Th17 development by promoting IL-23R expression and sustained STAT3 activation: *Blood* (2011), v. 118, p. 6107-14.
- Di Stefano, A., G. Caramori, I. Gnemmi, M. Contoli, C. Vicari, A. Capelli, F. Magno, S. E. D'Anna, A. Zanini, P. Brun, P. Casolari, K. F. Chung, P. J. Barnes, A. Papi, I. Adcock, and B. Balbi, T helper type 17-related cytokine expression is increased in the bronchial mucosa of stable chronic obstructive pulmonary disease patients: *Clin Exp Immunol* (2009), v. 157, p. 316-24.
- Dijkstra, K. K., S. B. Hoeks, B. J. Prakken, and S. de Roock, TH17 differentiation capacity develops within the first 3 months of life: *J Allergy Clin Immunol* (2014), v. 133, p. 891-4.e5.
- Domagala-Kulawik, J., Effects of cigarette smoke on the lung and systemic immunity: *J Physiol Pharmacol* (2008), v. 59 Suppl 6, p. 19-34.
- Eustace, A., L. J. Smyth, L. Mitchell, K. Williamson, J. Plumb, and D. Singh, Identification of cells expressing IL-17A and IL-17F in the lungs of patients with COPD: *Chest* (2011), v. 139, p. 1089-100.
- Grumelli, S., D. B. Corry, L. Z. Song, L. Song, L. Green, J. Huh, J. Hacken, R. Espada, R. Bag, D. E. Lewis, and F. Kheradmand, An immune basis for lung parenchymal destruction in chronic obstructive pulmonary disease and emphysema: *PLoS Med* (2004), v. 1, p. e8.
- Harrington, L. E., R. D. Hatton, P. R. Mangan, H. Turner, T. L. Murphy, K. M. Murphy, and C. T. Weaver, Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages: *Nat Immunol* (2005), v. 6, p. 1123-32.
- Harrison, O. J., J. Foley, B. J. Bolognese, E. Long, P. L. Podolin, and P. T. Walsh, Airway infiltration of CD4+ CCR6+ Th17 type cells associated with chronic cigarette smoke induced airspace enlargement: *Immunol Lett* (2008), v. 121, p. 13-21.
- Hautamaki, R. D., D. K. Kobayashi, R. M. Senior, and S. D. Shapiro, Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice: *Science* (1997), v. 277, p. 2002-4.
- Herberth, G., D. Hinz, S. Röder, U. Schlink, U. Sack, U. Diez, M. Borte, and I. Lehmann, Maternal immune status in pregnancy is related to offspring's immune responses and atopy risk: *Allergy* (2011), v. 66, p. 1065-74.
- Hill, J. A., M. Feuerer, K. Tash, S. Haxhinasto, J. Perez, R. Melamed, D. Mathis, and C. Benoist, Foxp3 transcription-factor-dependent and -independent regulation of the regulatory T cell transcriptional signature: *Immunity* (2007), v. 27, p. 786-800.
- Hogg, J. C., and W. Timens, The pathology of chronic obstructive pulmonary disease: *Annu Rev Pathol* (2009), v. 4, p. 435-59.
- Holt, P. G., and C. A. Jones, The development of the immune system during pregnancy and early life: *Allergy* (2000), v. 55, p. 688-97.

## 7. Literaturverzeichnis

- Hoover, D. M., C. Boulegue, D. Yang, J. J. Oppenheim, K. Tucker, W. Lu, and J. Lubkowski, The structure of human macrophage inflammatory protein-3 $\alpha$  /CCL20. Linking antimicrobial and CC chemokine receptor-6-binding activities with human beta-defensins: *J Biol Chem* (2002), v. 277, p. 37647-54.
- Ivanov, I. I., B. S. McKenzie, L. Zhou, C. E. Tadokoro, A. Lepelley, J. J. Lafaille, D. J. Cua, and D. R. Littman, The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$  directs the differentiation program of proinflammatory IL-17<sup>+</sup> T helper cells: *Cell* (2006), v. 126, p. 1121-33.
- Jetten, A. M., Retinoid-related orphan receptors (RORs): critical roles in development, immunity, circadian rhythm, and cellular metabolism: *Nucl Recept Signal* (2009), v. 7, p. e003.
- Jones, C. E., and K. Chan, Interleukin-17 stimulates the expression of interleukin-8, growth-related oncogene- $\alpha$ , and granulocyte-colony-stimulating factor by human airway epithelial cells: *Am J Respir Cell Mol Biol* (2002), v. 26, p. 748-53.
- Kang, M. J., J. M. Choi, B. H. Kim, C. M. Lee, W. K. Cho, G. Choe, D. H. Kim, C. G. Lee, and J. A. Elias, IL-18 induces emphysema and airway and vascular remodeling via IFN- $\gamma$ , IL-17A, and IL-13: *Am J Respir Crit Care Med* (2012), v. 185, p. 1205-17.
- Kerzel, S., J. Dehne, T. Rogosch, B. Schaub, R. F. Maier, and M. Zemlin, T(H)17 Cell Frequency in Peripheral Blood from Children with Allergic Asthma Correlates with the Level of Asthma Control: *Journal of Pediatrics* (2012), v. 161, p. 1172-1174.
- Korn, T., E. Bettelli, W. Gao, A. Awasthi, A. Jäger, T. B. Strom, M. Oukka, and V. K. Kuchroo, IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells: *Nature* (2007), v. 448, p. 484-7.
- Korn, T., E. Bettelli, M. Oukka, and V. K. Kuchroo, IL-17 and Th17 Cells: *Annu Rev Immunol* (2009), v. 27, p. 485-517.
- Korn, T., Disentangling the manifold functions of ROR $\gamma$ t: *Nat Immunol* (2017), v. 18, p. 1059-1060.
- Kurimoto, E., N. Miyahara, A. Kanehiro, K. Waseda, A. Taniguchi, G. Ikeda, H. Koga, H. Nishimori, Y. Tanimoto, M. Kataoka, Y. Iwakura, E. W. Gelfand, and M. Tanimoto, IL-17A is essential to the development of elastase-induced pulmonary inflammation and emphysema in mice: *Respir Res* (2013), v. 14, p. 5.
- Lee, G. R., The Balance of Th17 versus Treg Cells in Autoimmunity: *Int J Mol Sci* (2018), v.19
- Lee, S. H., S. Goswami, A. Grudo, L. Z. Song, V. Bandi, S. Goodnight-White, L. Green, J. Hacken-Bitar, J. Huh, F. Bakaeen, H. O. Coxson, S. Cogswell, C. Storness-Bliss, D. B. Corry, and F. Kheradmand, Antielastin autoimmunity in tobacco smoking-induced emphysema: *Nat Med* (2007), v. 13, p. 567-9.
- Lee, S., J. Kim, H. Min, R. H. Seong, ROR $\gamma$ t-driven TH17Cell Differentiation requires Epigenetic Control by the Swi/Snf Chromatin Remodeling Complex: *iScience* (2020) v. 23

## 7. Literaturverzeichnis

- Lee, S. K., J. Y. Kim, M. Lee, A. Gilman-Sachs, and J. Kwak-Kim, Th17 and regulatory T cells in women with recurrent pregnancy loss: *Am J Reprod Immunol* (2012), v. 67, p. 311-8.
- Li, M. O., S. Sanjabi, and R. A. Flavell, Transforming growth factor-beta controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms: *Immunity* (2006), v. 25, p. 455-71.
- Li, X. N., X. Pan, and D. Qiu, Imbalances of Th17 and Treg cells and their respective cytokines in COPD patients by disease stage: *Int J Clin Exp Med* (2014), v. 7, p. 5324-9.
- Liang, S. C., A. J. Long, F. Bennett, M. J. Whitters, R. Karim, M. Collins, S. J. Goldman, K. Dunussi-Joannopoulos, C. M. Williams, J. F. Wright, and L. A. Fouser, An IL-17F/A heterodimer protein is produced by mouse Th17 cells and induces airway neutrophil recruitment: *J Immunol* (2007), v. 179, p. 7791-9.
- Manel, N., D. Unutmaz, and D. R. Littman, The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor ROR $\gamma$ : *Nat Immunol* (2008), v. 9, p. 641-9.
- Mazzoni, A., V. Santarlasci, L. Maggi, M. Capone, M. C. Rossi, V. Querci, R. De Palma, H. D. Chang, A. Thiel, R. Cimaz, F. Liotta, L. Cosmi, E. Maggi, A. Radbruch, S. Romagnani, J. Dong, and F. Annunziato, Demethylation of the RORC2 and IL-17A in human CD4<sup>+</sup> T lymphocytes defines Th17 origin of nonclassic Th1 cells: *J Immunol* (2015), v. 194, p. 3116-26.
- McGeachy, M. J., K. S. Bak-Jensen, Y. Chen, C. M. Tato, W. Blumenschein, T. McClanahan, and D. J. Cua, TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology: *Nat Immunol* (2007), v. 8, p. 1390-7.
- McGuire, D. J., A. L. Rowse, H. Li, B. J. Peng, C. M. Sesterro, K. S. Cashman, P. De Sarno, and C. Raman, CD5 enhances Th17-cell differentiation by regulating IFN- $\gamma$  response and ROR $\gamma$ t localization: *Eur J Immunol* (2014), v. 44, p. 1137-42.
- Molet, S., Q. Hamid, F. Davoine, E. Nutku, R. Taha, N. Pagé, R. Olivenstein, J. Elias, and J. Chakir, IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines: *J Allergy Clin Immunol* (2001), v. 108, p. 430-8.
- Nurieva, R., X. O. Yang, G. Martinez, Y. Zhang, A. D. Panopoulos, L. Ma, K. Schluns, Q. Tian, S. S. Watowich, A. M. Jetten, and C. Dong, Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells: *Nature* (2007), v. 448, p. 480-3.
- Oda, N., P. B. Canelos, D. M. Essayan, B. A. Plunkett, A. C. Myers, and S. K. Huang, Interleukin-17F induces pulmonary neutrophilia and amplifies antigen-induced allergic response: *Am J Respir Crit Care Med* (2005), v. 171, p. 12-8.
- Park, H., Z. Li, X. O. Yang, S. H. Chang, R. Nurieva, Y. H. Wang, Y. Wang, L. Hood, Z. Zhu, Q. Tian, and C. Dong, A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17: *Nat Immunol* (2005), v. 6, p. 1133-41.
- Quintana, F. J., A. S. Basso, A. H. Iglesias, T. Korn, M. F. Farez, E. Bettelli, M. Caccamo, M. Oukka, and H. L. Weiner, Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor: *Nature* (2008), v. 453, p. 65-71.

## 7. Literaturverzeichnis

- Rabe, K. F., S. Hurd, A. Anzueto, P. J. Barnes, S. A. Buist, P. Calverley, Y. Fukuchi, C. Jenkins, R. Rodriguez-Roisin, C. van Weel, J. Zielinski, and G. I. f. C. O. L. Disease, Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary: *Am J Respir Crit Care Med* (2007), v. 176, p. 532-55.
- Rouvier, E., M. F. Luciani, M. G. Mattéi, F. Denizot, and P. Golstein, CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a herpesvirus saimiri gene: *J Immunol* (1993), v. 150, p. 5445-56.
- Salvi, S. S., and P. J. Barnes, Chronic obstructive pulmonary disease in non-smokers: *Lancet* (2009), v. 374, p. 733-43.
- Schaub, B., J. Liu, S. Höppler, I. Schleich, J. Huehn, S. Olek, G. Wieczorek, S. Illi, and E. von Mutius, Maternal farm exposure modulates neonatal immune mechanisms through regulatory T cells: *J Allergy Clin Immunol* (2009), v. 123, p. 774-82.e5.
- Schelonka, R. L., A. Maheshwari, W. A. Carlo, S. Taylor, N. I. Hansen, D. E. Schendel, P. Thorsen, K. Skogstrand, D. M. Hougaard, R. D. Higgins, and N. N. R. Network, T cell cytokines and the risk of blood stream infection in extremely low birth weight infants: *Cytokine* (2011), v. 53, p. 249-55.
- Schindler T. I., Wagner J.-J., Goedicke-Fritz S., Rogosch T., Coccejus V., Laudenbach V., Nikolaizik W., Härtel Ch., Maier R.F., Kerzel S., Zemlin M., TH17 cell frequency in peripheral blood is elevated in overweight children without chronic inflammatory diseases, *Frontiers in Immunology, Section T Cell Biology* (2017), 8: 1543.
- Schmitt, N., and H. Ueno, Regulation of human helper T cell subset differentiation by cytokines: *Curr Opin Immunol* (2015), v. 34, p. 130-6.
- Shan, M., H. F. Cheng, L. Z. Song, L. Roberts, L. Green, J. Hacken-Bitar, J. Huh, F. Bakaeen, H. O. Coxson, C. Storness-Bliss, M. Ramchandani, S. H. Lee, D. B. Corry, and F. Kheradmand, Lung myeloid dendritic cells coordinately induce TH1 and TH17 responses in human emphysema: *Sci Transl Med* (2009), v. 1, p. 4ra10.
- Shan, M., X. Yuan, L. Z. Song, L. Roberts, N. Zarinkamar, A. Seryshev, Y. Zhang, S. Hilsenbeck, S. H. Chang, C. Dong, D. B. Corry, and F. Kheradmand, Cigarette smoke induction of osteopontin (SPP1) mediates T(H)17 inflammation in human and experimental emphysema: *Sci Transl Med* (2012), v. 4, p. 117ra9.
- Shapiro, S. D., N. M. Goldstein, A. M. Houghton, D. K. Kobayashi, D. Kelley, and A. Belaaouaj, Neutrophil elastase contributes to cigarette smoke-induced emphysema in mice: *Am J Pathol* (2003), v. 163, p. 2329-35.
- Shen, F., M. W. Zhao, B. He, J. J. Yang, F. Pei, and Y. Z. Wang, [The changes and significance of interleukin-17 in rat models of chronic obstructive pulmonary disease and asthma]: *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi* (2004), v. 27, p. 654-8.
- Silverman, E. K., and F. E. Speizer, Risk factors for the development of chronic obstructive pulmonary disease: *Med Clin North Am* (1996), v. 80, p. 501-22.
- Singh, S. P., H. H. Zhang, J. F. Foley, M. N. Hedrick, and J. M. Farber, Human T cells that are able to produce IL-17 express the chemokine receptor CCR6: *J Immunol* (2008), v. 180, p. 214-21.
- Sonnenberg, G. F., M. G. Nair, T. J. Kirn, C. Zaph, L. A. Fouser, and D. Artis,



## 7. Literaturverzeichnis

- Pathological versus protective functions of IL-22 in airway inflammation are regulated by IL-17A: *J Exp Med* (2010), v. 207, p. 1293-305.
- Tesmer, L. A., S. K. Lundy, S. Sarkar, and D. A. Fox, Th17 cells in human disease: *Immunol Rev* (2008), v. 223, p. 87-113.
- Tuomela, S., V. Salo, S. K. Tripathi, Z. Chen, K. Laurila, B. Gupta, T. Äijö, L. Oikari, B. Stockinger, H. Lähdesmäki, and R. Lahesmaa, Identification of early gene expression changes during human Th17 cell differentiation: *Blood* (2012), v. 119, p. e151-60.
- Vargas-Rojas, M. I., A. Ramírez-Venegas, L. Limón-Camacho, L. Ochoa, R. Hernández-Zenteno, and R. H. Sansores, Increase of Th17 cells in peripheral blood of patients with chronic obstructive pulmonary disease: *Respir Med* (2011), v. 105, p. 1648-54.
- Veldhoen, M., K. Hirota, A. M. Westendorf, J. Buer, L. Dumoutier, J. C. Renauld, and B. Stockinger, The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins: *Nature* (2008), v. 453, p. 106-9.
- Veldhoen, M., R. J. Hocking, C. J. Atkins, R. M. Locksley, and B. Stockinger, TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells: *Immunity* (2006), v. 24, p. 179-89.
- Vogelmeier, C., R. Buhl, C. P. Criée, A. Gillissen, P. Kardos, D. Köhler, H. Magnussen, H. Morr, D. Nowak, D. Pfeiffer-Kascha, W. Petro, K. Rabe, K. Schultz, H. Sitter, H. Teschler, T. Welte, R. Wettengel, H. Worth, D. Atemwegsliga, and D. G. f. P. u. Beatmungsmedizin, [Guidelines for the diagnosis and therapy of COPD issued by Deutsche Atemwegsliga and Deutsche Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin]: *Pneumologie* (2007), v. 61, p. e1-40.
- Voss, M., L. Wolf, A. Kamyschnikow, B. Wonnenberg, A. Honecker, C. Herr, P. M. Lepper, M. Wegmann, M. D. Menger, R. Bals, and C. Beisswenger, Il-17A contributes to maintenance of pulmonary homeostasis in a murine model of cigarette smoke-induced emphysema: *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* (2015), v. 309, p. L188-95.
- Wilson, N. J., K. Boniface, J. R. Chan, B. S. McKenzie, W. M. Blumenschein, J. D. Mattson, B. Basham, K. Smith, T. Chen, F. Morel, J. C. Lecron, R. A. Kastelein, D. J. Cua, T. K. McClanahan, E. P. Bowman, and R. de Waal Malefyt, Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells: *Nat Immunol* (2007), v. 8, p. 950-7.
- Wu, B., Wan, Y., Molecular control of pathogenic Th17 cells in autoimmune diseases: *Int Immunopharmacol* (2020), v.80
- Xiao, S., H. Jin, T. Korn, S. M. Liu, M. Oukka, B. Lim, and V. K. Kuchroo, Retinoic acid increases Foxp3+ regulatory T cells and inhibits development of Th17 cells by enhancing TGF-beta-driven Smad3 signaling and inhibiting IL-6 and IL-23 receptor expression: *J Immunol* (2008), v. 181, p. 2277-84.
- Yang, X. O., R. Nurieva, G. J. Martinez, H. S. Kang, Y. Chung, B. P. Pappu, B. Shah, S. H. Chang, K. S. Schluns, S. S. Watowich, X. H. Feng, A. M. Jetten, and C. Dong, Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs: *Immunity* (2008), v. 29, p. 44-56.
- Zhang, F., G. Meng, and W. Strober, Interactions among the transcription factors Runx1, RORgamma and Foxp3 regulate the differentiation of interleukin 17-producing T cells: *Nat Immunol* (2008), v. 9, p. 1297-306.

- Zhou, L., I. I. Ivanov, R. Spolski, R. Min, K. Shenderov, T. Egawa, D. E. Levy, W. J. Leonard, and D. R. Littman, IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways: *Nat Immunol* (2007), v. 8, p. 967-74.
- Zhou, L., J. E. Lopes, M. M. Chong, I. I. Ivanov, R. Min, G. D. Victora, Y. Shen, J. Du, Y. P. Rubtsov, A. Y. Rudensky, S. F. Ziegler, and D. R. Littman, TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgammat function: *Nature* (2008), v. 453, p. 236-40.

## 8. Anhang

### 8.1. Patientenkollektiv

**Tabelle 27: Patientenkollektiv: Neugeborene**

Neugeborene	Charakteristika
Anzahl; n	17
Weiblich; n (%)	11 (65 %)
Gestationsalter; Wochen+Tage Median (Streuung)	37+6 (29+0 – 41+1)
Anteil der CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD161 <sup>+</sup> CCR6 <sup>+</sup> -Zellen an der Th-Zellpopulation (%) Mittelwert ± Standardfehler	0,40 ± 0,10
Anteil der CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> IL-17 <sup>+</sup> -Zellen an der Th-Zellpopulation (%) Mittelwert ± Standardfehler	2,5 ± 0,4
ΔCT von RORγt vor Stimulation Mittelwert ± Standardfehler	10,26 ± 0,76
ΔCT von IL-17 vor Stimulation	Kein Nachweis
ΔCT von RORγt nach Stimulation Mittelwert ± Standardfehler	7,56 ± 0,9
ΔCT von IL-17 nach Stimulation Mittelwert ± Standardfehler	2,34 ± 1,32

**Tabelle 28: Patientenkollektiv: Kinder im Alter von 4 – 17 Jahre**

Kinder und Jugendliche (4 – 17 Jahre)	Charakteristika
Anzahl; n	21
Weiblich; n (%)	15 (71)
Alter; Jahre Median (Streuung)	10 <sup>10/12</sup> (14 <sup>11/12</sup> - 5 <sup>8/12</sup> )
Anteil der CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD161 <sup>+</sup> CCR6 <sup>+</sup> -Zellen an der Th-Zellpopulation Mittelwert ± Standardfehler	4,94 ± 0,45

## 8. Anhang

Anteil der CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> IL-17 <sup>+</sup> - Zellen an der Th-Zellpopulation Mittelwert ± Standardfehler	<b>22,53 ± 2,26</b>
ΔCT von RORγt vor Stimulation Mittelwert ± Standardfehler	<b>8,00 ± 4,23</b>
ΔCT von IL-17 vor Stimulation	<b>Kein Nachweis</b>
ΔCT von RORγt nach Stimulation Mittelwert ± Standardfehler	<b>7,60 ± 0,33</b>
ΔCT von IL-17 nach Stimulation Mittelwert ± Standardfehler	<b>6,8 ± 0,65</b>

**Tabelle 29: Pateientenkollektiv: Patienten mit COPD und gesunde Probanden**

<b>Erwachsene</b>	<b>Patienten mit COPD</b>	<b>Gesunde Probanden</b>
Anzahl; n	<b>13</b>	<b>13</b>
Weiblich; n (%)	<b>2 (15)</b>	<b>10 (77)</b>
Alter; Jahre Median (Streuung)	<b>73 (54 – 76)</b>	<b>23 (22 – 33)</b>
(Ex-) Raucher; n (%)	<b>12 (92)</b>	<b>1 (7)</b>
FeV1 (% Ist) Mittelwert ± Standardfehler	<b>59,55 ± 3,39</b>	
FeV1/FVC (%) Mittelwert ± Standardfehler	<b>67,96 ± 4,29</b>	
Anteil der CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD161 <sup>+</sup> CCR6 <sup>+</sup> - Zellen an der Th-Zellpopulation Mittelwert ± Standardfehler	<b>8,6 ± 1,56</b>	<b>4,84 ± 0,93</b>
Anteil der CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> IL-17 <sup>+</sup> - Zellen an der Th-Zellpopulation Mittelwert ± Standardfehler	<b>39,04 ± 5,3</b>	<b>37,15 ± 3,65</b>
ΔCT von RORγt vor Stimulation Mittelwert ± Standardfehler	<b>7,51 ± 0,57</b>	<b>8,27 ± 0,39</b>
ΔCT von IL-17 vor Stimulation	<b>Kein Nachweis</b>	<b>Kein Nachweis</b>
ΔCT von RORγt nach Stimulation		

## 8. Anhang

Mittelwert $\pm$ Standardfehler	<b>7,57 <math>\pm</math> 0,38</b>	<b>6,58 <math>\pm</math> 0,7</b>
$\Delta$ CT von IL-17 nach Stimulation		
Mittelwert $\pm$ Standardfehler	<b>5,27 <math>\pm</math> 0,49</b>	<b>6,03 <math>\pm</math> 0,41</b>

## 8.2. Veröffentlichungen

Schindler T. I., Wagner J.-J., Goedicke-Fritz S., Rogosch T., Coccejus V., Laudenbach V., Nikolaizik W., Härtel Ch., Maier R.F., Kerzel S., Zemlin M.

„TH17 cell frequency in peripheral blood is elevated in overweight children without chronic inflammatory diseases“

Veröffentlichung in Frontiers in Immunology, Section T Cell Biology, 2017; 8: 1543.

Coccejus V., Schindler T. I., Laudenbach, V., Wagner J.-J., Kerzel, S., Maier R.F., Goedicke-Fritz, S., Rogosch T., Zemlin M.

„Altersabhängigkeit der Th17-Zellfrequenz“

Vortrag auf der 112. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kinder- und Jugendmedizin, Hamburg, 2016

Coccejus V., Schindler T. I., Laudenbach V., Härtel M.K., Wagner J.-J., Maier R.F., Kerzel S., Rogosch T., Zemlin M.

„Die Stimulierbarkeit von Th17-Zellen im Nabelschnurblut nimmt im letzten Schwangerschaftsdrittel zu“

Poster auf der 111. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kinder- und Jugendmedizin, München, 2015

T.I. Schindler, J.-J.Wagner, V. Coccejus, V. Laudenbach, T. Rogosch, R.F. Maier, M. Zemlin, S. Kerzel

„Erhöhter Anteil von TH17-Zellen im peripheren Blut bei Kindern mit allergischer Rhinokonjunktivitis“

Poster auf der 111. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kinder- und Jugendmedizin, München, 2015

### **8.3. Verzeichnis meiner akademischen Lehrer an der Philipps-Universität Marburg**

Meine akademischen Lehrer waren Damen/Herren in Marburg

Adamkiewicz, Arabin, Awe, Baarlink, Barth, Bartsch, Bauer, Baum, Baumann, Becker, Becker, Bender, Bertoune, Best, Bette, Bien, Bliemel, Bonaterra, Bösner, Bouchard, Brandt, Braun, Brehm, Brendel, Bücking, Carl, Cassebaum, Cetin, Cherkasov, Czubayko, Dannlowski, Daut, Decher, del Rey, Depboylu, Dodel, Donner-Banzhoff, Duda, Eberhart, Eggert, Ehlenz, Eickmann, Engenhart-Cabillic, Enzensberger, Falkenberg, Fendrich, Feuser, Fisseni, Fritz, Fuchs-Winkelmann, Gebhardt, Glatz, Göbert, Görg, Gratz, Gress, Greulich, Grgic, Grikscheit, Grosse, Grundmann, Haberhausen, Halaszovich, Hegele, Hertl, Heverhagen, Heyd, Hildebrandt, Hofmann, Holland, Hoyer, Jaques, Jerrentrup, Jomaa, Josephs, Kalder, Kann, Kerwat, Kimberger, Kinscherf, Kircher, Kircher, Klose, Kluge, Knipper, Knöppel, Koczulla, Koehler, Köhler, König, Kösters, Kruse, Kühnert, Kussin, Lauth, Leonhardt, Librizzi, Lill, Lohoff, Löw, Lüsebrink, Luster, Mahnken, Maier, Maisner, Mand, Mandic, Manthey, Markus, Mayer, Meissner, Menzler, Milani, Moll, Moosdorf, Mueller, Müller, Mutters, Neubauer, Neumüller, Nikolaizik, Nimphius, Nimsky, Nonnenmacher, Oberwinkler, Oliver, Opitz, Pagenstecher, Pankuweit, Pantazis, Pape-Meyer, Parahuleva, Patrascan, Peterlein, Pfützner, Plant, Preisig-Müller, Puccetti, Quint, Ramaswamy, Reese, Renz, Repenning, Richter, Riera-Knorrenschild, Ries, Roeßler, Rogosch, Rost, Röttgers, Ruchholtz, Rüsch, Sahmland, Schäfer, Schäfer, Schales, Schieffer, Schmid, Schneider, Schoner, Schratt, Schröder, Schu, Schulze, Schütz, Schwabe, Schwarz, Seifart, Seipelt, Seitz, Sekundo, Sevinc, Shams-Eldin, Sommer, Stahl, Steinfeldt, Steiniger, Steinkamp, Stief, Stiewe, Strik, Suske, Tackenberg, Teymoortash, Thieme, Timmesfeld, Topp, Träger, Uphoff, Vassiliou, Vogelmeier, Vogt, Wagner, Wanzel, Weber, Weihe, Werner, Westerman, Westermann, Westhoff, Wiegand, Wilhelm, Wollmer, Worzfeld, Wrocklage, Wulf, Zapf, Zavorotnyy, Zemlin, Zentgraf, Ziller, Zovko

### 8.4. Danksagung

Zunächst möchte ich herzlich Herrn Professor Maier für die Überlassung dieses Promotionsthemas danken. Nur durch seine Unterstützung und interessanten Anregungen konnte diese Arbeit überhaupt umgesetzt werden. Mein besonderer Dank gilt ebenfalls meinem Betreuer Herrn Professor Zemlin, der mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand und mir als Mensch und Arzt mit seiner herzlichen und authentischen Art ein Vorbild ist. Auch Herr PD Dr. Rogosch und Frau Dr. Goedicke-Fritz waren für die Umsetzung dieser Arbeit unerlässlich und halfen mir bei jeglichen Fragen zu Auswertung, Statistik und wissenschaftlichen Zusammenhängen immer kompetent weiter. Ich bin sehr dankbar, dass sie zu jeder Zeit ein offenes Ohr für mich hatten und mich auch in Phasen der Frustration immer ermutigt haben das Ziel nicht aus den Augen zu verlieren. Ich möchte mich besonders herzlich bei Regina Stöhr und Sabine Jennemann bedanken. Sie unterstützen mich immer in allen Belangen und sind mir auch nach Abschluss der Laborarbeiten weiterhin eine große Stütze und zu guten Freunden geworden. Ich möchte außerdem Frau Dr. Schindler danken, die mich hervorragend in die Methodik eingearbeitet hat und mir eine gute Freundin geworden ist. Insgesamt, möchte ich allen für die wunderschöne gemeinsame Zeit in der Arbeitsgruppe danken. Diese Zeit hat mich nicht nur wissenschaftlich, sondern auch als Mensch positiv geprägt.

Ein weiterer Dank gilt der Arbeitsgruppe Koczulla/Greulich, die mir Blutproben von erwachsenen Probanden und COPD-Patienten zur Verfügung gestellt hat, sodass eine Erweiterung des untersuchten Spektrums erst möglich wurde.

Die Umsetzung dieser Arbeit wäre ohne meine Familie nicht möglich gewesen, für all die Unterstützung vor, während und nach dem Studium bin ich ihr sehr dankbar. Zusätzlich möchte ich auch all meinen Freunden, ehemaligen Kommilitonen und Kollegen danken, die mich immer, trotz teils weiter Entfernungen und nur gelegentlichem Kontakt, immer unterstützt und aufgebaut haben.